



Titre: Contrôle de la diffusion de nanoparticules dans un gel par effet d'affinité : un modèle pour la livraison de médicaments
Title:

Auteur: Audrey Roth
Author:

Date: 2019

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Roth, A. (2019). Contrôle de la diffusion de nanoparticules dans un gel par effet d'affinité : un modèle pour la livraison de médicaments [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/3804/>
Citation:

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/3804/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Gregory De Crescenzo, & Xavier Banquy
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Contrôle de la diffusion de nanoparticules dans un gel par effet d'affinité : un modèle pour
la livraison de médicaments**

AUDREY ROTH

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Janvier 2019

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

Affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Contrôle de la diffusion de nanoparticules dans un gel par effet d'affinité : un modèle pour
la livraison de médicaments**

présenté par **Audrey ROTH**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Nick VIRGILIO, président

Gregory DE CRESCENZO, membre et directeur de recherche

Xavier BANQUY, membre et codirecteur de recherche

Davide BRAMBILLA, membre

DÉDICACE

A mes parents et Joris.

REMERCIEMENTS

Une maîtrise est bien plus qu'un projet de recherche, c'est aussi une aventure humaine enrichissante. Ces deux ans m'ont permis de grandir et je ne pourrais continuer mon chemin sans remercier les personnes qui m'ont accompagnée et aidée dans cette aventure.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Gregory de Crescenzo, de m'avoir fait confiance en m'intégrant dans son groupe de recherche. Merci pour ta disponibilité, tes précieux conseils mais aussi et surtout ta motivation sans faille pour la recherche scientifique qui a su m'encourager dans les moments difficiles de mon projet. Merci infiniment pour ces deux années !

J'aimerais également remercier mon co-directeur, Xavier Banquy, pour son implication tout au long de mon projet. Tu as toujours été disponible pour me donner des conseils, me remettre dans la bonne voie ou encore m'encourager quand il le fallait. Merci pour tout !

J'aimerais également adresser un remerciement spécial à Frédéric et Benoît pour leur soutien et surtout tout ce qu'ils m'ont appris au laboratoire. Ce n'était pas un travail facile, mais vous y êtes arrivé. Merci Pierre-Luc pour ta patience et ton aide si précieuse avec la DDM.

Je souhaite exprimer mes remerciements envers tous les membres des deux laboratoires avec qui j'ai noué de belles amitiés. Je commencerais par Gwendoline et Frédéric, mes compères de laboratoire, pour tous ces beaux moments à base de rires et de gâteaux. Vous avez définitivement rendu ces deux années plus belles. Merci à tous ceux du PJAB, anciens et nouveaux, avec qui j'ai partagé des moments joyeux : Benoît, Célestine, Chloé, Eric, Florian, Glwadys, Kahina, Kurt, Léa, Ousamah, Romane. De même, merci à tous ceux du Jean Coutu : Araceli, Arnould, Augustine, Cyrielle, Hélène, Jimmy, Marziye, Pierre-Luc, Vahid.

Je souhaite remercier ma famille pour son soutien sans faille même dans les moments difficiles. Un merci tout spécial à Joris. Il serait bien trop long de détailler ton apport pendant ces deux années, mais sache que je t'en suis reconnaissante. Mes remerciements ne sauraient être complets sans un mot à Nano, merci pour ton réconfort doux et poilu.

RÉSUMÉ

L'administration de médicaments est un enjeu crucial de la médecine actuelle. Les exigences dans le traitement des patients deviennent de plus en plus importantes : le traitement doit être personnalisé, plus efficace, moins contraignant, etc. Cela a conduit à un important effort de recherche dans le domaine (bio)pharmaceutique et biomédical. Un des principaux objectifs de ces recherches est le contrôle de la libération des agents thérapeutiques pour permettre une administration efficace, localisée et prolongée. De nombreuses méthodes sont étudiées comme l'utilisation de micro- ou nanovecteurs (liposomes, particules polymériques, particules inorganiques, etc) ou le développement d'hydrogels chargés en principe actif. Néanmoins, contrôler la vitesse de libération de l'agent thérapeutique reste un véritable défi. Les systèmes d'affinité semblent être des candidats potentiels pour pallier cela. En effet, quelques groupes de recherche ont montré que l'utilisation d'une interaction spécifique (d'où le terme « affinité ») entre le vecteur et l'agent thérapeutique peut permettre de contrôler la libération de certaines protéines. Cependant, ces systèmes sont généralement basés sur une propriété propre à l'agent thérapeutique d'intérêt et ils ne peuvent être utilisés pour une grande plage de molécules. Le travail de recherche présenté ici propose l'utilisation de peptides superhélices, plus précisément le système peptidique Ecoil/Kcoil, pour contrôler la diffusion de nanoparticules d'or dans un hydrogel d'alginate. Des nanoparticules (NPs) d'or ont été fonctionnalisées avec une protéine chimère correspondant au peptide Ecoil fusionné au facteur de croissance épidermique (EGF). La bioactivité du EGF greffé a été vérifiée par un test de phosphorylation des récepteurs EGF de cellules A431 et la biodisponibilité du peptide Ecoil a été testée en immobilisant les nanoparticules sur des surfaces décorées avec le peptide Kcoil. Ensuite, nous avons réalisé un hydrogel d'alginate décoré avec le peptide Kcoil. Les chaînes d'alginate ont été fonctionnalisées via une chimie click azide-alcyne et

la diffusion des NPs dans des hydrogels possédant différentes densités de Kcoil a été étudiée par microscopie différentielle dynamique (DDM) ainsi que par des tests de libération. Les résultats ont montré que la diffusion des nanoparticules d'or était ralentie d'un facteur deux dans des hydrogels contenant une quantité suffisante de Kcoil comparée à dans un hydrogel sans Kcoil. Ces résultats permettent de confirmer que le système peptidique Ecoil/Kcoil permet de contrôler la libération de nanoparticules hors d'un hydrogel, ouvrant la voie à de nombreuses applications en administration de médicaments, thérapie cancéreuse ou encore en médecine régénératrice.

ABSTRACT

Drug delivery is a highly active field of research in today medicine. Treatments must be more personalized, efficient and compliant, leading to a significant research effort in the (bio)pharmaceutical and biomedical domain. A key goal of this research is the controlled release of therapeutic agents for an efficient, localized and sustained release. Diverse methods have been studied, including the use of micro- or nanoparticles (liposomes, polymeric or inorganic particles, etc) or the development of hydrogels loaded with therapeutic agents. However, the control of the drug release rate remains a challenge. Affinity based-systems have been proposed as interesting alternatives to achieve a controlled release. Indeed, several research teams have shown that a specific interaction between the vector and the therapeutic agent (hence the term ‘affinity’) could allow for a controlled release of some proteins. Unfortunately, those systems generally depend on a natural characteristic of the therapeutic agent and cannot be applied to a large variety of molecules. The work presented here takes advantage of specific peptides forming coiled-coil structures, namely the Ecoil/Kcoil coils, to control decorated gold nanoparticle (NP) diffusion in an alginate hydrogel. Gold NPs have first been functionalized with a chimeric protein corresponding to the fusion of the Ecoil peptide to the epidermal growth factor (EGF). Bioactivity of grafted EGF has been confirmed in an in vitro cell assay based on the EGF receptor phosphorylation, while the bioavailability of the Ecoil peptide has been tested by immobilizing the decorated NPs on a Kcoil decorated surface. Alginate hydrogels were then designed by functionalizing alginate chains with the Kcoil peptide using alkyne-azide click chemistry. NP diffusion in alginate hydrogels of various Kcoil densities were studied by differential dynamic microscopy (DDM) and traditional release assays. Results demonstrated a factor two slowdown of NPs diffusion in hydrogels containing a sufficient amount of Kcoil peptide. This confirms that

E/Kcoil system can control the release of nanoparticles from a hydrogel and paves the way to a broad range of applications in drug delivery, cancer therapy or regenerative medicine.

TABLES DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VII
TABLES DES MATIÈRES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte du projet	1
1.2 Problématique et hypothèses	2
1.3 Objectifs	3
1.3.1 Objectif I	3
1.3.2 Objectif II	3
1.3.3 Objectif III.....	4
CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	5
2.1 Contrôler l'administration de principes actifs.....	5
2.1.1 Les micro- et nanovecteurs	5
2.1.2 Les hydrogels	16
2.2 Les peptides synthétiques d'affinité.....	26
2.2.1 Définition	26
2.2.2 Les peptides superhélices	27

2.2.3	L'hétérodimère Ecoil/Kcoil.....	29
CHAPITRE 3	DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT INDIQUANT LA COHÉRENCE DE L'ARTICLE PAR RAPPORT AUX OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	31
CHAPITRE 4	ARTICLE 1 : A COILED-COIL AFFINITY-BASED SYSTEM FOR THE CONTROLLED RELEASE OF BIOFUNCTIONALIZED GOLD NANOPARTICLES FROM ALGINATE HYDROGELS	32
4.1	Présentation de l'article.....	32
4.2	Header : Biomacromolecules	33
4.3	Author affiliations	33
4.4	Abstract	34
4.5	Keywords	34
4.6	Introduction	34
4.7	Experimental	37
4.7.1	Materials.....	37
4.7.2	Biofunctionalization of gold nanoparticles	38
4.7.3	Bioadhesion of the functionalized nanoparticles	40
4.7.4	Kcoil grafting on alginate.....	40
4.7.5	NP release from alginate matrix.....	41
4.7.6	Dynamic differential microscopy (DDM).....	42
4.7.7	In vitro cell assay.....	43
4.8	Results and discussion.....	44
4.8.1	Characterization of pristine and functionalized NPs.....	45
4.8.2	Bioadhesion and bioactivity of the functionalized AuNPs	47
4.8.3	Characterization of Kcoil grafting on alginate	50

4.8.4	Diffusion and release tests.....	51
4.9	Conclusions	58
4.10	Notes.....	58
4.11	Acknowledgement.....	59
4.12	References	59
CHAPITRE 5	DISCUSSION GÉNÉRALE	64
CHAPITRE 6	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	67
RÉFÉRENCES	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des différents nanovecteurs.....	14
Table 2 : Characteristics of bare and functionalized gold nanoparticles.	47
Table 3 : Results of the fitting parameters obtained using Eq. 6.....	57

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1: Représentation schématique de la structure d'un liposome (A) et des différentes modifications de surface qui peuvent être apportées pour augmenter leur stabilité et leur circulation (B), le ciblage (C) ou encore utiliser les liposomes en imagerie (D). Figure adaptée de [14]	6
Figure 2.2 : Schéma de la structure des nanoparticules lipidiques NSL et VLN. Figure adaptée de [18].	9
Figure 2.3 : Schéma de la structure des nanocapsules et nanosphères.....	11
Figure 2.4 : Schéma explicatif des types de réticulations physiques (interactions hydrophobes, interactions électrostatiques, liaison H en haut de gauche à droite) et chimiques (liens covalents ou agents de réticulation en bas de gauche à droite)	17
Figure 2.5 : Courbes de libération caractéristiques. En rouge, la libération est brutale («Burst release»). En bleu, la libération présente une libération rapide pendant un temps court, puis se stabilise à une vitesse constante. En jaune, la libération est constante dans le temps. En pratique, la courbe jaune est rarement obtenue, on retrouvera plutôt le profil bleu.....	19
Figure 2.6 : Stratégie de contrôle de libération par affinité. Figure adaptée de [56]	23
Figure 2.7 : Schéma explicatif d'un dimère ayant une structure «coiled-coil». A) Vue d'au-dessus de la superhélice. B) Vue latérale de la superhélice. Le cœur hydrophobe est représenté par les résidus a, a', d et d' entre les deux hélices α . Les interactions électrostatiques dans la séquence répétitive sont montrées entre les résidus g et e' d'une part (bleu et orange) et e et g' d'autre part (cyan et rouge). Reproduit et adapté de [78].	28
Figure 2.8 : Représentation schématique d'une heptade du Ecoil et du Kcoil et de leur organisation dans la structure superhélice. Adaptée de [6].....	30
Figure 4.1 : Preparation of the affinity-based hybrid system using gold nanoparticles and an alginate scaffold. (A) AuNPs were first PEGylated to a low level for stabilization. Cys-Ecoil-EGF (CEE) was then grafted via thiol-gold chemistry. A second PEGylation step was then performed for higher stability. (B) Alginate chains were first derivatized with an alkyne moiety using glycidyl propargyl ether (GPE). Azidohomoalanine-tagged Kcoil peptides (Aha-	

Kcoil) were then grafted via azide-alkyne click chemistry. (C) The dispersion of Ecoil-AuNPs in the Kcoil-alginate hydrogel enabled the formation of the E/K coiled-coil complex to slow down NPs release.44

Figure 4.2 : Transmission electron microscopy (TEM) image of AuNPs. The average NPs diameter measured was 18 ± 2 nm (n=100).45

Figure 4.3 : Bioadhesion and bioactivity of functionalized NPs. (A) Bioadhesion on a Kcoil-derivatized surface of NP-CEE-PEG_{HD}, NP-EGF-PEG_{HD}, and NP-PEG_{HD} as control, as detected by anti-EGF ELISA (n=3) (B) EGFR phosphorylation in A431 cells upon binding with soluble EGF (10, 1, 0.1 and 0 nM), NP-CEE-PEG_{HD} or NP-EGF-PEG_{HD} (EGF concentration of 1.5 nM according to ELISA) and NP-PEG_{HD}, as monitored by Western Blot. The 180-kDa band immunoreactive to anti-phosphotyrosine antibodies (corresponding to EGFR) was quantified using a ChemiDoc and Image Lab software. Y-axis represents the equivalent concentration in soluble EGF (sEGF) (n = 3 for NP-CEE-PEG_{HD} and NP-EGF-PEG_{HD} and n = 1 for NP-PEG_{HD}, * indicates statistical differences between datasets (bilateral t-test, p < 0.05).49

Figure 4.4 : Synthesis and characterization of Kcoil-derivatized alginate. (A) Alginate was first modified with glycidyl propargyl ether (GPE). Azide-terminated Kcoil peptides were then grafted on alginate-GPE via alkyne-azide click chemistry in presence of copper sulfate. (B and C) The percentage of alkyne-modified monomers was quantified by ¹H NMR using the peak at 3.4 ppm (peak A), corresponding to the alkyne, and the peaks at 5.5 ppm (G1) and 5.1 ppm (M1) as reference, corresponding to the total amount of monomers.51

Figure 4.5 : Diffusive properties of NPs assessed by differential dynamic microscopy. (A) Intermediate scattering function $f(q, \tau) = \exp(-(\tau/\tau_R)\beta)$ of NP-CEE-PEG_{HD} (red circles) and NP-PEG_{HD} (black squares) in water, Alg-Kcoil10% and Alg-Kcoil20%. In Alg-Kcoil10%, ISF were calculated using a double exponential as in Eq.6. Insets represent the coefficient diffusion D (averaged from 5 videos) vs q for each type of NPs. Different q-values were used for each medium to best represent the short-time plateau and the long-time plateau of the ISF. (B) Diffusion coefficients of NP-CEE-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD}, as determined by DDM. The Y-axis represents the ratio between the coefficients of diffusion of NPs in the hydrogels, D,

and in water, D_w . * indicates statistical differences between datasets ($n = 5$) (bilateral t-test, $p < 0.05$).53

Figure 4.6 : NPs release from Kcoil-modified alginate hydrogels. NP-CEE-PEG_{HD} (A) and NP-PEG_{HD} (B) are released from Alg-Kcoil0%, Alg-Kcoil10% and Alg-Kcoil20%, as calculated from the number of NPs still entrapped in the gel relative to $t = 0$. NP-CEE-PEG_{HD} (C) and NP-PEG_{HD} (D) data were fitted with a power-law model: each exponent was found to be between 0.43 and 1, characteristic of diffusion (both Fickian and non-Fickian), except for NP-CEE-PEG_{HD} in Alg-Kcoil20%. ($n \geq 4$)55

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
AuNP	Nanoparticules d'or
bFGF	Facteur de croissance des fibroblastes basique
BSA	(Bovin Serum Albumin) Albumine de Sérum Bovin
CEE	EGF étiqueté d'un Ecoil, terminé par une Cystéine
Con A	Concanavaline A
DDM	(Differential dynamic Microscopy) Microscopie Dynamique Différentielle
DLS	(Dynamic Light Scattering) Diffusion Dynamique de Lumière
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
EGF	Facteur de croissance épidermique
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique
FBS	(Fetal Bovin Serum) Sérum de Foetus Bovin
GPE	Glycidyl propargyl ether
HRP	Horseradish Peroxidase
MEC	Matrice Extracellulaire
MP	Microparticule
NiPAAM	N-isopropylacrylamide
NP	Nanoparticule
PA	Principe Actif
PBS	(Phosphate Buffer Saline) Solution Tampon de phosphate

PBS-T	Solution Tampon de phosphate avec 0.1% de Tween20
PDGF-BB	Facteur de croissance dérivé des plaquettes BB
PEG	Poly(Ethylene) Glycol
PLA	Poly-Lactique Acide
PLGA	Poly-Glycolique-Co-Lactique acide
NSL	Nanoparticules Solides Lipidiques
PDI	Indice de polydispersité
rhFGF2	Facteur de croissance des fibroblastes recombinant humain 2
RT	(Room Temperature) Température ambiante
SD	Déviati on standard
SH3	Domaine SRC Homologie 3
TGF β 1	Facteur de croissance transformant β 1
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acide
THPTA	Tris(3-HydroxyPropylTriazolylmethyl)Amine
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothélial
VNL	Vecteur à Nanostructure Lipidique

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte du projet

L'administration de principes actifs (PA) est un enjeu essentiel dans le domaine pharmaceutique. Il est important que le PA soit administré suivant la règle des 5B - le Bon médicament, au Bon patient, à la Bonne dose, par la Bonne voie et au Bon moment - si l'on veut obtenir un traitement efficace ou même éviter des effets secondaires [1]. Assurer une administration optimale suivant ces critères a mené à de nombreuses collaborations entre scientifiques et praticiens de la santé, et ce depuis les années 1950. De nos jours, de nombreux traitements, et donc PA, continuent de causer des effets secondaires dans des parties initialement saines du corps, limitant l'utilisation de certains PA malgré leur efficacité. Le cancer est un des exemples les plus parlants de cette limitation.

De plus, ces dernières années, les scientifiques ont commencé à s'intéresser à des technologies d'administration du médicament plus complexes, par exemple pour l'insuline, mais aussi à administrer des molécules moins conventionnelles comme les acides nucléiques. [2]. Ces molécules nécessitent une administration contrôlée dans des zones difficiles d'accès avec les méthodes classiques d'administration. Les exigences en termes de libération du PA se sont également accrues, passant de quelques heures ou jours à quelques mois de libération. En effet, pour des applications comme la médecine régénératrice, le temps de guérison s'étend sur de très longues périodes et des PA doivent être libérés en permanence pour aider les cellules à créer de nouveaux tissus. Des technologies visant à cibler certaines parties du corps ou encore un certain type de cellules, font également l'objet de nombreuses recherches et semblent être la réponse idéale pour diminuer les effets secondaires causés par certains PA.

Cependant, malgré des années de recherche, les formulations développées sont encore loin de tenir leurs promesses. Beaucoup de PA sont hydrophobes et donc difficiles à dissoudre dans des liquides physiologiques, ce qui rend difficile le développement de formulations pouvant être utilisées cliniquement. Les PA hydrophiles à haut poids moléculaire posent également des défis aux scientifiques. Les protéines par exemple sont facilement dénaturées et proposer une libération prolongée de ces dernières est encore problématique [2].

Des efforts de recherche sont donc encore nécessaires afin d'améliorer l'administration des médicaments au niveau clinique. Néanmoins, une grande partie des études menées reste prometteuse quant au traitement de nombreuses maladies ou pathologies.

1.2 Problématique et hypothèses

Contrôler la libération d'un PA par un vecteur de livraison s'avère un point extrêmement important dans le domaine de l'administration de médicaments. Comme vu précédemment, il est important de libérer le PA au bon moment, au bon endroit et à la bonne dose. Plusieurs technologies ont été étudiées dans ce but. L'une des technologies les plus fréquentes est l'encapsulation du PA dans un hydrogel. Les hydrogels sont des réseaux de polymères fortement hydrophiles, ayant des propriétés proches de celles de la matrice extracellulaire. Disséminer le PA à l'intérieur de l'un de ces hydrogels permet de ralentir sa libération lorsque celui-ci est placé dans le corps, mais aussi et surtout d'obtenir une libération très localisée. Si l'hydrogel a, de plus, la propriété d'être injectable, le système devient prometteur pour l'administration du principe actif.

La libération du PA par l'hydrogel peut s'effectuer selon plusieurs mécanismes (gonflement, dégradation, *etc.*) et de nombreuses études ont montré que cette libération peut être contrôlée de cette manière [3]–[5]. Cependant, maîtriser la libération brutale, ou le « burst release » en anglais, s'avère toujours être un défi. Cette libération est caractérisée par une libération rapide et importante de PA lors des premiers temps d'incubation de l'hydrogel. La vitesse de libération se stabilise ensuite. Quelques systèmes d'affinité se sont montrés capables de diminuer ce « burst release », mais sont basés sur des propriétés propres aux protéines livrées.

D'autre part, disséminer le PA dans un hydrogel nécessite l'utilisation d'un PA hydrophile puisque les hydrogels sont formés en milieu aqueux. Les PA hydrophobes ou non solubles en milieux aqueux sont exclus de cette utilisation. Les technologies favorisées pour ce type de molécules seront l'encapsulation dans des liposomes, micelles ou autres nanoparticules polymériques. Néanmoins, ces techniques sont généralement moins localisées et les effets secondaires plus importants.

Il manque donc une technique universelle, ou du moins plus polyvalente, qui permettrait la libération contrôlée et localisée d'une large gamme de PA. L'utilisation d'un système hybride,

composé à la fois de nanoparticules et d'un hydrogel, pourrait allier les avantages de chacun tout en annulant leurs inconvénients. Les nanoparticules, chargées en PA, seraient disséminées dans l'hydrogel, assurant ainsi une libération localisée. Suivant l'hydrophobicité du PA, celui-ci peut être chargé en surface ou encapsulé dans la nanoparticule. Le présent travail vise donc à étudier la faisabilité de lier de manière spécifique, par effet d'affinité, des nanoparticules dans un hydrogel. Pour les fins de notre étude, des nanoparticules d'or combinées à un gel d'alginate ont été choisies afin de démontrer la faisabilité ainsi que les avantages de notre plateforme de livraison.

Notre hypothèse de travail est que le contrôle de la libération de nanoparticules peut être réalisé grâce à un système peptidique composé des peptides superhélices Ecoil et Kcoil. Ces peptides ont la particularité de s'assembler et de former un hétérodimère superhélice lorsqu'ils sont mis en présence l'un de l'autre. Leur affinité est élevée et peut être facilement modifiée en changeant leur séquence ou en diminuant le nombre d'heptades qui composent leur séquence [6], [7]. Notre hypothèse est que la concentration des superhélices dans le gel peut contrôler la libération des nanoparticules.

1.3 Objectifs

1.3.1 Objectif I

Le premier objectif à atteindre lors de ce projet est la fonctionnalisation de nanoparticules avec le peptide Ecoil. Cet objectif se décompose en plusieurs sous-objectifs : (i) synthétiser des nanoparticules, (ii) créer une bibliothèque de nanoparticules portant des quantités différentes de Ecoil à la surface, (iii) caractériser complètement et exhaustivement les nanoparticules.

1.3.2 Objectif II

Le deuxième objectif de ce projet est la biofonctionnalisation du polymère utilisé comme hydrogel avec le peptide Kcoil (peptide se liant à son peptide partenaire – le Ecoil). La méthode de fonctionnalisation est à déterminer pour optimiser le rendement de la réaction.

Une caractérisation du greffage devra être menée afin de déterminer le nombre de peptides Kcoil par chaîne polymérique. Ce polymère devant servir d'hydrogel par la suite, la fonctionnalisation ne doit pas perturber la gélification.

1.3.3 Objectif III

Le dernier objectif consiste à disperser les nanoparticules fonctionnalisées dans l'hydrogel et étudier leur libération par l'hydrogel. L'effet de la concentration en Kcoil dans le gel et le nombre de Ecoil sur les nanoparticules sur la libération devra être étudié pour vérifier que cette plateforme technologique peut être adaptée facilement.

CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 Contrôler l'administration de principes actifs

2.1.1 Les micro- et nanovecteurs

2.1.1.1 Définition

Les micro- et nanovecteurs sont définis comme des systèmes de très petites tailles, de 1 à 1000 nm, qui véhiculent un principe actif jusqu'à sa cible [8]. Suscitant un intérêt certain de la communauté scientifique, ils ont largement été étudiés depuis les années 1960. Leur intérêt réside dans leur potentiel à contrer trois problématiques récurrentes de l'administration d'agents thérapeutiques [9]. Tout d'abord, en modifiant leur surface avec des protéines spécifiques, il est possible de leur faire cibler certains tissus ou cellules, sans affecter les autres. Cette spécificité permet d'éviter des effets secondaires néfastes, par exemple lorsqu'un agent cytotoxique entre en contact avec une cellule saine. Ensuite, ils sont capables de se rendre aux sites où les cellules ciblées se trouvent, ce qui n'est pas toujours le cas des méthodes conventionnelles d'administration. C'est notamment le cas pour les maladies neurologiques où la barrière hémato-encéphalique empêche la circulation d'agents thérapeutiques. Par design, les nanovecteurs augmentent le temps de circulation des petites molécules ou peptides thérapeutiques en leur fournissant une protection contre la dégradation enzymatique ou environnementale [8]. Enfin, ils peuvent être chargés de plusieurs PA. Cela peut être très utile en thérapie cancéreuse où l'usage de deux PA simultanément est parfois nécessaire. Les nanovecteurs peuvent prendre différentes formes et compositions (liposomes, micelles, particules, etc), les plus fréquentes sont décrites plus en détail par la suite.

2.1.1.2 Les liposomes

Découverts dans les années 1960 par Bangham et al, les liposomes ont vivement intéressé la communauté scientifique [10]. Si leur potentiel en médecine et biologie a été rapidement décrit, les études les concernant ont continué durant les 50 dernières années suivantes pour aboutir à des liposomes approuvés et vendus commercialement de nos jours [11]–[13]. Les liposomes sont composés d'une ou plusieurs couches concentriques lipidiques formant un compartiment aqueux

(Figure 2.1.A). Cette structure leur permet d'encapsuler à la fois des molécules hydrophobes dans la couche lipidique et hydrophile dans leur centre aqueux. La gamme de molécules pouvant être utilisées avec les liposomes est donc très large, ce qui explique l'intérêt scientifique dirigé vers eux. De plus, leur structure est similaire à celle des membranes cellulaires.

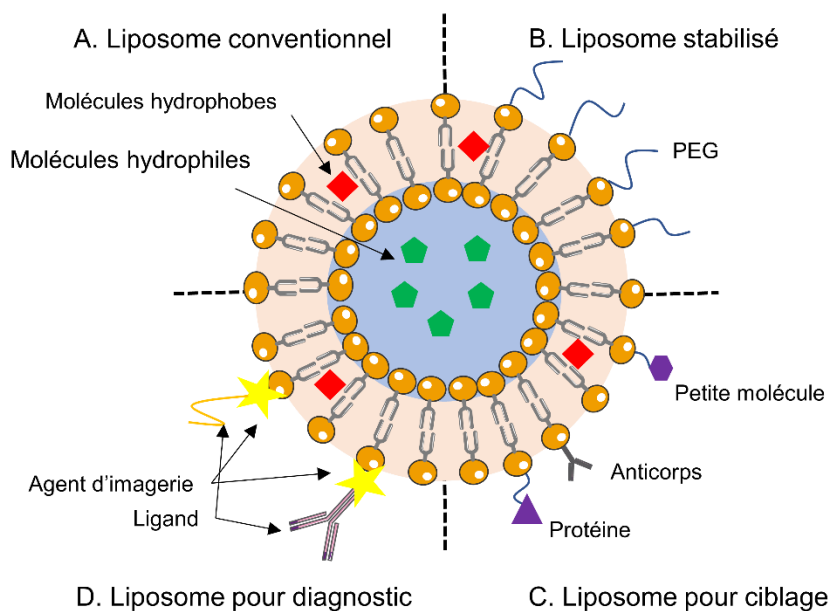


Figure 2.1: Représentation schématique de la structure d'un liposome (A) et des différentes modifications de surface qui peuvent être apportées pour augmenter leur stabilité et leur circulation (B), le ciblage (C) ou encore utiliser les liposomes en imagerie (D). Figure adaptée de [14]

Les liposomes ont de nombreux avantages en tant que vecteurs de livraison, notamment leur biocompatibilité et leur faible toxicité puisqu'ils sont souvent composés de phospholipides naturels [14]. Ils ont également l'avantage de pouvoir s'autoassembler et peuvent encapsuler de grosses molécules actives. Enfin, leurs propriétés physicochimiques peuvent être facilement modifiées pour adapter le liposome à l'application voulue.

Au cours des années, la formulation et la complexité des liposomes se sont enrichies pour prévenir certains problèmes. En effet, un liposome est initialement formé d'une bicouche lipidique, composée de phospholipides anionique, cationique ou neutre. Si ces liposomes ont permis de diminuer la toxicité par rapport à la molécule active libre, ils ont généralement une faible stabilité qui peut entraîner un relâchement précoce de la molécule encapsulée et une polydispersité non contrôlée [15]. De plus, des études ont également montré que les liposomes étaient éliminés rapidement du sang par les macrophages et avaient tendance à s'accumuler dans les reins et le foie, diminuant ainsi leur efficacité. Pour augmenter le temps de circulation des liposomes dans le sang, certaines études ont proposé de les stabiliser de façon stérique. Le poly(éthylène glycol) (PEG) semble être le choix optimal pour diminuer la reconnaissance des liposomes par le système réticulo-endothélial et les macrophages (Figure 2.1.B). Les liposomes stabilisés montrent également une stabilité accrue, ce qui diminue les effets secondaires [14].

Les liposomes sont généralement administrés par voie intraveineuse et circulent donc dans le sang [11], il n'y a donc pas d'interaction avec les organes ou cellules cibles qui favoriseraient leur accumulation près de ceux-ci. De nouveaux liposomes ont donc été mis au point pour remédier à cette problématique. En effet, des chercheurs ont recouvert les liposomes de biomolécules (des ligands) comme des peptides, des anticorps ou encore des glucides ayant une forte affinité pour des molécules (des récepteurs) surexprimées par les cellules cibles (Figure 2.1.C) [16]. Cette méthode permet de livrer spécifiquement la molécule d'intérêt, puisque le ligand interagira avec son récepteur sur la membrane cellulaire, augmentant ainsi le taux de liposomes accumulés au voisinage des cellules cibles [14].

Enfin, d'autres études ont voulu utiliser les liposomes à des fins de diagnostic et d'imagerie. Les liposomes ont alors été combinés à un agent d'imagerie et à une biomolécule pour cibler des cellules surexprimant un certain récepteur (Figure 2.1.D). L'agent permet ensuite de déterminer où sont accumulées ces cellules particulières [14].

Ainsi, même si les liposomes présentent quelques limitations comme leur faible capacité d'encapsulation et une libération souvent rapide de la molécule active, ils sont toujours encore considérés comme le système de livraison le plus avancé. En effet, plusieurs applications sont aujourd'hui au stade d'essai clinique ou proche d'être commercialisées et certaines formulations sont déjà approuvées et utilisées commercialement [11].

2.1.1.3 Autres nanoparticules lipidiques

D'autres nanoparticules lipidiques ont été mises au point pour pallier les faibles taux de chargement et stabilité des liposomes [17]. Appelées nanoparticules solides lipidiques (NSL), elles sont constituées de lipides qui sont solides à température ambiante ou du corps. Des surfactants sont utilisés pour stabiliser les nanoparticules (Figure 2.2). Ceux-ci peuvent être des triglycérides, un mélange plus ou moins complexe de glycérides, ou même des cires. Si ces nanoparticules ont une très bonne stabilité physique par rapport aux liposomes, leur capacité de chargement reste généralement faible, autour de 25% [17]. Ce faible taux de chargement est dû au fait que la molécule active s'introduit dans les imperfections du cristal, entre les chaînes d'acides gras. Le cristal formé n'est pas parfaitement ordonné. En augmentant le chargement, on augmente le nombre d'imperfections du cristal et par conséquent sa stabilité diminue. La limite de solubilité de la molécule active dans le mélange lipidique est un autre frein au chargement de celle-ci. De plus, lors du stockage, le cristal des nanoparticules peut changer de conformation, entraînant l'expulsion du principe actif hors de la nanoparticule. Ces limitations expliquent pourquoi un mélange complexe de lipides est généralement utilisé [17]. Cependant, les nanoparticules lipidiques ont l'intérêt de protéger la molécule active de la dégradation, d'avoir une bonne biocompatibilité et d'avoir un effet très localisé. De plus, il est assez facile de les modifier pour contrôler la vitesse de libération.

NPs solides lipidiques (NSL) Vecteurs lipidiques à nanostructure (VLN)

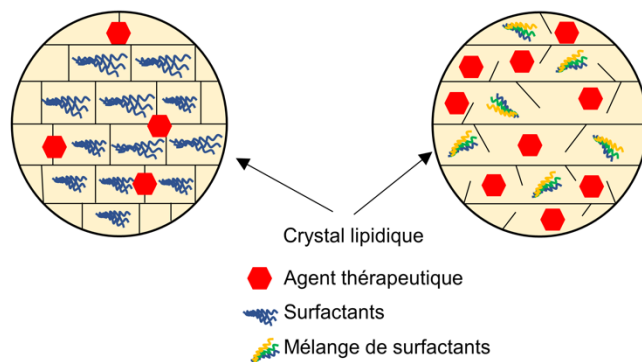


Figure 2.2 : Schéma de la structure des nanoparticules lipidiques NSL et VLN. Figure adaptée de [18].

Dans les années 1990, une nouvelle forme de nanoparticules lipidiques a été introduite pour contrer les inconvénients des NSL [17]. Les vecteurs lipidiques à nanostructure (VLN) misent sur une nanostructure pour augmenter la capacité de chargement des nanoparticules et éviter l'effet d'expulsion (Figure 2.2). Trois méthodes sont utilisées pour arriver à cela. La première consiste à utiliser différentes chaînes lipidiques pour que la distance entre les acides gras, et donc le nombre d'imperfections, soit plus importante. Il y a donc plus de place libre dans le cristal pour insérer le principe actif. Une deuxième méthode consiste à augmenter la quantité d'huile incorporée au mélange de lipides solides lors de la réaction. En effet, si la limite de solubilité de l'huile dans le mélange de lipides est excédée, les phases se sépareront, ce qui formera des nano-compartiments huileux dans la matrice lipidique. Comme la plupart des molécules actives ont une solubilité plus importante dans l'huile que dans les lipides, il est possible de charger une quantité plus importante de molécules actives avec cette méthode. Enfin, certains groupes ont utilisé des nanoparticules lipidiques amorphes pour éviter le phénomène d'expulsion de la molécule active. En effet, lors du refroidissement, il n'y a pas de cristallisation avec ces lipides particuliers, ce qui évite les transformations de structure au cours du temps.

D'autres groupes ont étudié la formation de nanoparticules formées par un complexe lipides-molécules actives dans le but d'augmenter la capacité de chargement des nanoparticules lipidiques. Un conjugué insoluble est donc formé avec les lipides et le principe actif. Celui-ci peut être préparé

grâce à un lien covalent ou par formation d'un sel. Le conjugué est ensuite transformé en nanoparticules avec un surfactant aqueux en homogénéisant le mélange sous haute pression. Les capacités de chargement obtenues peuvent ainsi atteindre jusqu'à 33% [19]. Cette méthode permet également de charger des molécules actives qui ont des propriétés hydrophiles moins importantes.

2.1.1.4 Les micro- et nanoparticules polymériques

Les micro- et nanoparticules (MPs et NPs) polymériques sont un des systèmes les plus prometteurs pour la livraison de principes actifs. Ceux-ci sont en général emprisonnés dans des particules de polymères synthétiques ou naturels [20]. Les polymères les plus fréquemment utilisés sont l'acide poly-lactique (PLA) ou poly-glycolique-co-lactique (PLGA), l'alginate, la gélatine et le chitosane. Ces systèmes présentent les mêmes avantages que les nanoparticules lipidiques : protection de la molécule active contre la dégradation, libération contrôlée de la molécule, traitement plus efficace et durable, effets secondaires diminués, etc. Il est également possible de les fonctionnaliser avec des protéines comme des facteurs de croissance pour cibler certaines cellules ou la matrice extracellulaire.

La diversité de ce type de nanoparticules est très grande puisqu'il existe différentes manières d'introduire le principe actif dans la matrice polymérique. Le principe actif peut en effet être emprisonné, dissous, encapsulé ou encore attaché aux chaînes polymériques. De plus, deux structures de nanoparticules sont généralement définies : on parlera de nanosphères lorsque la structure est pleine et de nanocapsules lorsque la structure est vésiculaire [21], [22] (Figure 2.3). Dans le cas de nanocapsules, le principe actif est confiné à une cavité entourée par une unique couche de polymère alors que dans une nanosphère, le principe actif est dispersé physiquement et uniformément dans la particule. De plus, pour les deux types de NPs, on peut trouver des principes actifs attachés ou adsorbés à la surface.

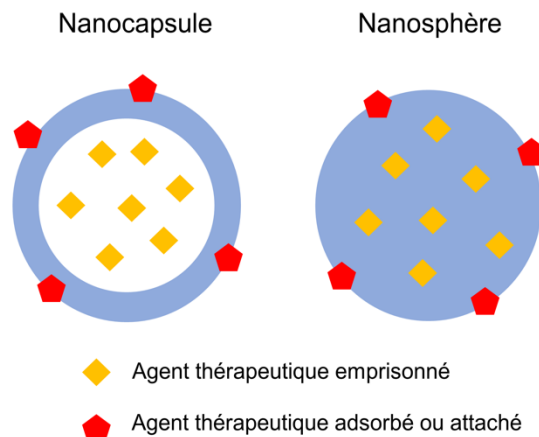


Figure 2.3 : Schéma de la structure des nanocapsules et nanosphères.

Il est possible de moduler la vitesse de libération du principe actif en jouant sur différents paramètres suivant le type de nanoparticules utilisées. La vitesse de libération dépend en premier lieu de la désorption de la molécule active. La vitesse de désorption varie fortement en fonction de la façon dont la molécule est liée à la matrice polymérique. Si la molécule est liée de façon covalente, la vitesse de désorption est généralement moins importante que si la molécule est simplement adsorbée. La molécule peut aussi interagir avec la matrice via des interactions électrostatiques ou un effet d'affinité. La diffusion de la molécule dans le polymère est un autre paramètre à contrôler pour moduler la vitesse de libération. Dans le cas de nanocapsules, cette vitesse agira directement sur la vitesse de libération puisque la molécule n'a qu'à traverser la paroi polymérique pour être libérée. Cependant, la diffusion a également une influence pour les nanosphères suivant la taille des pores ou la densité du polymère. Enfin, un paramètre primordial à contrôler est la vitesse de dégradation et d'érosion de la nanoparticule. Une dégradation rapide aura en effet tendance à augmenter la vitesse de libération de la molécule active. En somme, les deux principes gouvernant la vitesse de libération sont la diffusion et la dégradation.

Pour contrôler toujours plus précisément la relâche des agents thérapeutiques, des NPs capables de moduler leur libération en fonction des *stimuli* appliqués ont été mises au point [23]. Ces *stimuli* peuvent être endogènes. Les NPs et MPs réagiront alors à un changement de pH [24], à des enzymes [25] ou encore un changement de température [4] pour libérer leurs actifs. Des *stimuli* exogènes

tels que des ultrasons [26], un champ magnétique [27] ou encore des rayons UV ou IR [28] ont également été utilisés pour initier la libération.

La dégradation des nanoparticules est parfois accélérée par les protéines présentes dans le milieu physiologique. Il peut donc s'avérer stratégique de modifier la surface des nanoparticules pour améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques. Similairement aux liposomes, certains chercheurs ont ajouté du PEG à la surface des nanoparticules pour diminuer leur reconnaissance par les phagocytes [23]. En conséquence, cette modification permet d'augmenter le temps de circulation des nanoparticules dans le sang puisque le PEG crée une répulsion stérique avec les opsonines. D'autres groupes ont obtenu des résultats similaires en utilisant des poloxamères et des cyclodextrine [29].

2.1.1.5 Les nanoparticules inorganiques

Les NPs inorganiques sont composées de métaux, tels que l'or ou l'argent, d'oxydes ou encore de silice [30]. Elles peuvent avoir différentes géométries : sphères, bâtonnets, cubes, etc, et pour la plupart sont pleines, ce qui impose que le PA soit greffé sur leur surface, contrairement aux NPs organiques où il peut être encapsulé. Une chimie de surface est donc nécessaire pour fonctionnaliser la NPs avec le PA, ce qui peut parfois engendrer une perte de la bioactivité du PA. En effet, ce dernier doit être greffé sans utiliser un groupement du site actif et dans des conditions qui ne dégradent pas le PA. De plus, les NPs inorganiques doivent souvent subir des modifications chimiques ou biologiques pour être biocompatibles. A la manière des nanoparticules organiques, un traitement de surface doit alors être effectué (greffage de PEG, ajout de protéine, *etc*) [31]. Une chimie supplémentaire sera donc nécessaire.

Pour effectuer cette double fonctionnalisation, une méthode courante consiste à greffer un espaceur, une molécule organique avec deux groupements fonctionnels différents. Le premier groupement est destiné à se lier aux NPs alors que l'autre est utilisé pour fixer un ligand, une biomacromolécule ou encore un PA. La chimie utilisée pour greffer l'espaceur varie en fonction du type de NPs que l'on manipule. Par exemple, les silices réagissent avec des silanes via une réaction bien connue et caractérisée et l'or réagit avec une fonction thiol, groupement que l'on peut facilement ajouter à des protéines ou peptides [32], [33]. De l'autre côté, des amines ou des groupements carboxyliques sont fréquemment étudiés pour fixer la molécule active à l'autre bout

de l'espaceur. D'autres chercheurs ont aussi évalué l'utilisation d'interactions électrostatiques ou hydrophobes pour lier des agents thérapeutiques. Par exemple, Kneuer *et al* ont fixé des chaînes d'ADN chargées négativement sur des nanoparticules de silice fonctionnalisées avec des amines [32]. A pH physiologique, les amines sont positives et peuvent donc interagir de façon électrostatique avec les chaînes d'ADN.

L'un des principaux intérêts des nanoparticules inorganiques réside dans leurs propriétés physiques uniques. En effet, elles ont souvent des propriétés optiques, magnétiques ou encore photothermiques qui leur donnent un avantage sur les NPs organiques. Widder *et al* ont été parmi les premiers à exploiter les propriétés des microparticules magnétiques en guidant les microparticules par un champ magnétique externe chez le rat [34]. Ce champ externe a permis d'obtenir une concentration suffisante de MPs chargées en agent cytotoxique pour obtenir une complète rémission des tumeurs. Pour beaucoup de MPs et NPs, ces propriétés physiques sont même utilisées comme thérapie en elle-même. Par exemple, les NPs d'or sont maintenant utilisées en thérapie photothermique [35], radiothérapie [36] ou comme système d'imagerie en temps réel [37].

Tableau 1: Tableau récapitulatif des avantages et inconvénients des différents nanovecteurs

Type de Nanovecteurs	Avantages	Inconvénients
Liposomes [11], [14], [16]	<ul style="list-style-type: none"> - Gamme de PA large (hydrophile et hydrophobe, grandes tailles) - Biocompatible - Chimie de surface facile pour fonctionnalisation - Protection du PA contre la dégradation 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible taux de chargement - Libération rapide - Instable
Nanoparticules Solides Lipidiques (NSL) [17]–[19]	<ul style="list-style-type: none"> - Biocompatible - Effet localisé - Vitesse de libération contrôlable - Protection du PA contre la dégradation 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible taux de chargement ($\approx 25\%$) - Instable - PA hydrophiles seulement
Vecteurs Lipidiques à Nanostructures (VLN) [18], [19]	<ul style="list-style-type: none"> - Taux de chargement plus élevé ($\approx 33\%$) - Biocompatible - Vitesse de libération contrôlable - Protection du PA contre la dégradation 	<ul style="list-style-type: none"> - PA hydrophiles seulement

<p>Micro- et nanoparticules polymériques</p> <p>[21], [22]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Vitesse de libération contrôlable et peut-être conséquente à des stimuli - Effet localisé - Chimie de surface facile pour fonctionnalisation - Protection du PA contre la dégradation - Gamme de PA large (hydrophile et hydrophobe) 	<ul style="list-style-type: none"> - Dégradation accélérée en milieu physiologique - Parfois instable
<p>Nanoparticules Inorganiques</p> <p>[30]–[32]</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Propriétés physiques intéressantes (magnétiques, photothermiques, optiques) - Pas ou peu de dégradation par le milieu physiologique 	<ul style="list-style-type: none"> - Possible perte de la bioactivité du PA après greffage - Instable sans modification surfacique

2.1.2 Les hydrogels

2.1.2.1 Définition

Les hydrogels sont composés de polymères hautement hydrophiles réticulés de façon chimique ou physique. Ils sont définis comme des matrices tridimensionnelles (3D) capables d'absorber une grande quantité d'eau et de gonfler tout en conservant leur structure [38]. Comme ils contiennent beaucoup d'eau et ont une structure proche de celle de la matrice extracellulaire, ils ont généralement une grande biocompatibilité [39]. C'est donc un matériau de choix pour des applications de livraison de principe actif ou de régénération tissulaire. Certains des hydrogels étudiés pour de telles applications sont d'origine naturelle (chitosane, acide hyaluronique, alginate, *etc*), ceux-ci sont généralement hautement biocompatibles et biodégradables, mais peuvent avoir de faibles propriétés mécaniques [40]–[42]. D'autres sont synthétiques (PEG, N-isopropylacrylamide (NiPAAM), *etc*) et ont souvent de meilleures propriétés mécaniques [43]. Certains groupes ont aussi développé des composites, c'est-à-dire un mélange de polymères naturels et synthétiques, pour obtenir des hydrogels ayant de bonnes propriétés mécaniques, biodégradables et biocompatibles [44].

2.1.2.1.1 La réticulation

Une propriété importante à contrôler est la réticulation de l'hydrogel. En effet, pour une application de livraison de PA, il sera préférable que la réticulation permette l'injection de l'hydrogel. Dans le cas inverse, celui-ci devra être implanté par chirurgie [39]. La réticulation dépend généralement du type de polymère utilisé puisqu'elle repose souvent sur une propriété particulière et peut être

chimique ou physique. Parmi les réticulations physiques, on compte les interactions hydrophobes, électrostatiques et les liaisons hydrogènes (Figure 2.4) [39].

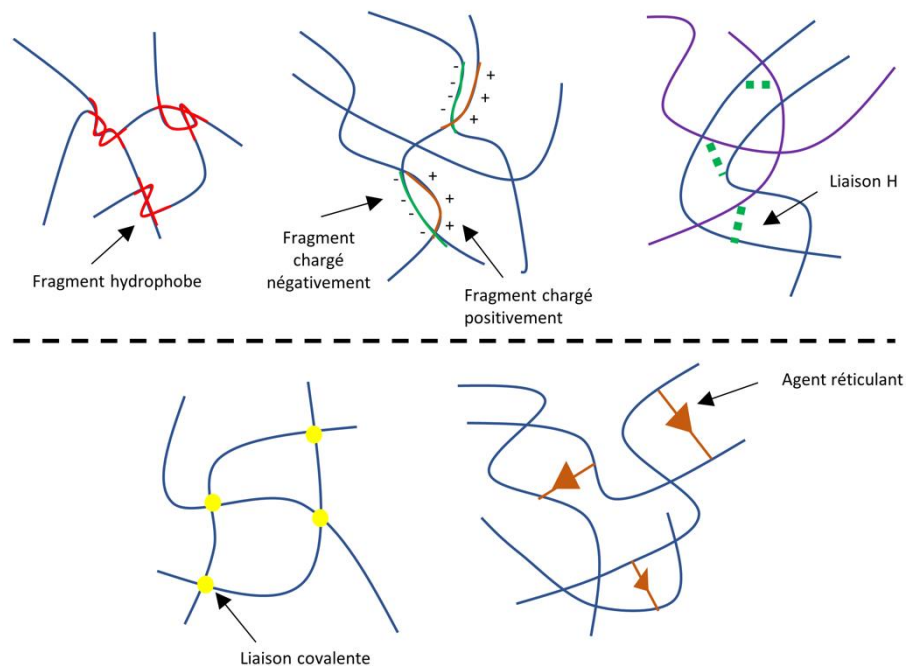


Figure 2.4 : Schéma explicatif des types de réticulations physiques (interactions hydrophobes, interactions électrostatiques, liaison H en haut de gauche à droite) et chimiques (liens covalents ou agents de réticulation en bas de gauche à droite)

Dans le premier cas, les chaînes du polymère vont comporter des fragments hydrophobes. Ces fragments vont avoir tendance à se regrouper de façon à minimiser leur surface en contact avec l'eau lorsque la température augmente (variation de température lors de l'injection dans le corps par exemple). La température à laquelle l'hydrogel gélifie va dépendre de la longueur des fragments hydrophobes, de leur structure et de leur concentration. Des hydrogels réticulés de façon électrostatique vont tirer parti de charges présentes sur les chaînes du polymère. En mélangeant ce polymère avec des ions ou un autre polymère de charge opposée, il est possible d'obtenir une réticulation. Ce type de gel est particulièrement intéressant en libération car la réticulation est sensible à la concentration en ions et peut donc être modulée par les ions présents dans le milieu physiologique ou par le pH de l'environnement qui influence la protonation des groupements

chargés. De plus, ce type d'hydrogel est en général injectable. Des liaisons hydrogènes ont également été reportées comme capables de réticuler des chaînes de polymères. En effet, lorsque l'on mélange deux polymères naturels on peut observer une viscosité supérieure à celle des deux polymères séparés. Appelé phénomène de synergie rhéologique, cette viscosité est due à des interactions hydrogènes qui se créent entre les chaînes de polymères. Cela nécessite toutefois une géométrie compatible. Il est possible de forcer l'injection de ces hydrogels en cassant temporairement les liaisons H et les hydrogels résultant ont souvent une bonne biocompatibilité. Cependant, les liaisons H étant assez faibles, l'hydrogel se dégrade rapidement dans le milieu physiologique où les contraintes mécaniques peuvent être importantes. Les réticulations physiques présentent l'énorme avantage d'être facile à mettre en place et permettent à l'hydrogel d'être injecté dans la majorité des cas. Malheureusement, leurs propriétés mécaniques restent faibles et il est difficile de jouer sur la taille des pores, le temps de gélification ou encore le temps de dégradation. S'il est nécessaire de contrôler ces paramètres, on préférera utiliser une réticulation chimique (Figure 2.4). La réticulation chimique nécessite de modifier les chaînes du polymère pour créer une liaison chimique entre elles. Il est également possible d'utiliser un agent de réticulation, une petite molécule contenant au moins deux groupements fonctionnels, pour réticuler les chaînes de polymère. En modulant la concentration de ces modifications, il est possible de moduler les caractéristiques de l'hydrogel (temps de gélification, taille des pores). Si la réticulation chimique permet d'obtenir des hydrogels avec de bonnes propriétés chimiques qui leur évitent une dégradation et une diffusion inopportune, les agents de réticulation et les chaînes modifiées peuvent s'avérer toxiques s'ils sont en trop grande concentration.

2.1.2.1.2 *La libération du principe actif*

La libération du principe actif par un hydrogel est contrôlée par plusieurs phénomènes et leur importance dépend des caractéristiques du gel. Le premier est la diffusion passive du PA dans le gel, reliée à la taille des pores et aux capacités de gonflement du gel. Plus les pores sont grands, plus le principe actif sera libéré rapidement car sa diffusion dans le gel sera similaire à sa diffusion dans l'eau. Si la taille des pores est inférieure à la taille du PA, celui-ci sera bloqué et ne sortira pas du gel. Il faut donc trouver un compromis sur la taille des pores qui permet de ralentir le PA sans l'arrêter complètement. En pratique, les tailles de pores reportées sont largement supérieures à celle

d'une petite molécule de principe actif, sa diffusion ne sera pas retardée, contrairement à des protéines qui ont un rayon hydrodynamique plus important. Il est possible de modifier la taille des pores en contrôlant la concentration de polymère ou d'agent réticulant. La dégradation chimique, par exemple par le clivage chimique des chaînes de polymère, ou sa dégradation enzymatique, aura également un impact sur la libération du PA. Enfin, l'érosion, un phénomène de surface qui engendre une dégradation du gel, peut aussi favoriser la libération du PA. [45]

Les hydrogels présentent généralement une libération en deux temps. Le premier temps est appelé la libération brutale ou « burst release » en anglais. Il s'agit d'une libération extrêmement rapide du PA qui intervient dans les premières heures de l'implantation du gel. Une fois un certain équilibre atteint, la libération aura un profil plus lent. Cependant, pour certains types d'hydrogel, la quantité de principe actif libéré lors de la libération brutale est très importante. Cette caractéristique peut être voulue pour des applications d'administration pulsatile ou ciblée, mais elle peut également limiter leur utilisation notamment lorsque le principe actif est toxique à fortes concentrations [46]. Il est donc parfois préférable d'avoir une libération contrôlée et soutenue dans le temps et c'est pourquoi de nombreux groupes ont donc cherché à diminuer le phénomène de libération brutale pour avoir une libération adaptée à l'application. Différentes approches ont été étudiées, certaines sont détaillées par la suite.

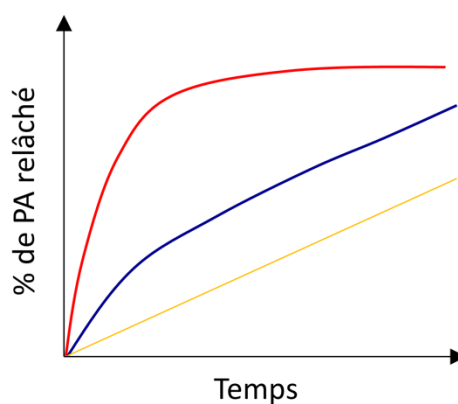


Figure 2.5 : Courbes de libération caractéristiques. En rouge, la libération est brutale («Burst release»). En bleu, la libération présente une libération rapide pendant un temps court, puis se

stabilise à une vitesse constante. En jaune, la libération est constante dans le temps. En pratique, la courbe jaune est rarement obtenue, on retrouvera plutôt le profil bleu.

2.1.2.2 Les hydrogels biodégradables

Les hydrogels biodégradables présentent un réel intérêt pour la livraison d'agent thérapeutique car ils ne nécessitent pas d'être enlevés de façon chirurgicale. Une fois mis en place, ils se dégradent à une certaine vitesse pour libérer petit à petit les agents thérapeutiques qu'ils renferment. Ici, la libération de ceux-ci est contrôlée par le gonflement [3]. Il est important de noter que les fragments dégradés doivent impérativement être biocompatibles et doivent pouvoir être éliminés par le corps. La dégradation du polymère va avoir comme conséquence l'augmentation de la taille des pores, et donc le gonflement de l'hydrogel.

Le défi principal dans le design de ces hydrogels est de conserver des bonnes propriétés mécaniques malgré la dégradation. Pour obtenir cela, une des méthodes les plus communes est d'interpénétrer deux types de polymères, l'un hydrophile, capable de gonfler beaucoup, l'autre hydrophobe et biodégradable [47]. Le ratio de concentration entre les deux polymères permet de contrôler les propriétés mécaniques, de dégradation et de gonflement. Des copolymères formés de segments ayant de telles propriétés ont aussi été mis au point [5].

Les mécanismes de dégradation rentrant en jeu dans les hydrogels biodégradables peuvent être classés en 4 catégories : la solubilisation, l'hydrolyse chimique, la dégradation enzymatique et les autres mécanismes. La solubilisation est une propriété de certains polymères qui absorbent une très grande quantité d'eau jusqu'à leur dissolution. C'est le cas par exemple du dextran, du poly(éthylène oxide), *etc.* La dissolution peut être influencée par les conditions de l'environnement telles que le pH, la force ionique ou encore la température. Certains polymères sont sujets à l'hydrolyse chimique et peuvent être utilisés en combinaison avec d'autres polymères hydrophiles pour obtenir un système biodégradable. L'hydrolyse chimique correspond généralement à l'hydrolyse des esters, formant ainsi des acides carboxyliques et des alcools. L'hydrolyse enzymatique est surtout importante pour les polysaccharides et les protéines, mais des polymères synthétiques peuvent également être dégradés de cette manière. Le collagène et les dextrans ont beaucoup été utilisés de cette manière. Les agents thérapeutiques étant libérés à la suite de ces modifications, certains groupes de recherche ont modifié ces polymères de façon à contrôler le

profil de libération. Enfin, il existe d'autres mécanismes de dégradation, moins fréquemment utilisés, comme l'échange d'ion, qui entraînera ensuite une solubilisation [47].

Les hydrogels biodégradables présentent de vrais avantages par rapport aux systèmes plus conventionnels (grande capacité d'encapsulation, contrôle du profil de libération, biodégradabilité, *etc*), ce qui explique leur présence actuelle en clinique [27]. En contrôlant la dégradation, avec une dégradation enzymatique par exemple, il est possible d'obtenir un ciblage d'un site particulier ; les hydrogels biodégradables peuvent même réagir aux changements du milieu physiologique (pH, température, *etc*) [47].

2.1.2.3 Les hydrogels intelligents

Un système de livraison idéal serait capable de répondre aux *stimuli* de son environnement pour libérer son PA. En effet, pour beaucoup de maladies l'administration de l'agent thérapeutique doit survenir à un moment précis, sous peine d'inhiber ses effets voire de causer des effets secondaires néfastes. Les hydrogels ont donc été modifiés de façon à ce que leur gonflement, leur structure, leur perméabilité ou encore leurs propriétés mécaniques changent en fonction des *stimuli* internes ou externes. Ces hydrogels sont appelés les hydrogels intelligents. De nombreux *stimuli* sont aujourd'hui étudiés, qu'ils soient internes (pH, force ionique, glucose, urée, *etc*) ou externes (électrique, magnétique, ultrasonique, thermique, *etc*) [48]. La réponse de l'hydrogel au *stimulus* peut être rapide et abrupte ou lente et graduelle, dépendamment du système utilisé et du mécanisme de libération qui entre en jeu.

Sous l'application d'un certain *stimulus*, les changements physiques d'un hydrogel peuvent être de plusieurs types. Un de changements physiques les plus communs est le gonflement de l'hydrogel en réponse au *stimulus* et sa rétraction lorsque celui-ci s'arrête. Des hydrogels ioniques ou gels polyélectrolytes sont fréquemment utilisés pour ce genre d'application. En effet, les changements électroniques des groupements acides dans le premier cas et ionisables dans le second, créent une pression osmotique supplémentaire de par les contre-ions emprisonnés dans le gel et la répulsion électrostatique entre les fragments de même charge [49], [50]. Cette pression est à l'origine du mécanisme de gonflement d'un tel hydrogel et est généralement réversible. Un autre changement physique fréquemment étudié pour créer un hydrogel intelligent est la précipitation ou gélification, réversible lorsque le *stimulus* s'arrête. Des fragments de polyols pluroniques ont par exemple été

utilisés pour induire la gélification de certains polymères à la température du corps humain [51], [52]. Des stimuli comme le pH peuvent également jouer un rôle sur les propriétés d'adsorption de l'hydrogel. Par exemple, Alvarez-Lorenzo et Concheiro ont étudié les profils de libération d'une petite molécule divalente par un hydrogel sensible au pH et à la température et ont montré que l'ajout de groupements amines dans un hydrogel de NiPAAM permettait d'avoir un chargement et une libération modulable en fonction des conditions du milieu (pH, température et force ionique) [53]. Enfin, d'autres mécanismes comme la dégradation (chimique ou enzymatique), l'érosion, *etc* ont également été utilisés pour libérer le PA de façon intelligente [54].

Un des plus gros défis de la livraison de PA reste de nos jours la libération de l'insuline pour le traitement du diabète. Comme l'insuline doit être administrée dans un volume précis, à un moment précis, les hydrogels intelligents, capables de s'autoréguler, ont fait l'objet d'un grand intérêt de la communauté scientifique. Des hydrogels avec capteurs de glucose ont donc été mis au point. Ces systèmes utilisent par exemple des changements de pH suite à l'action d'une enzyme, l'oxydase de glucose qui transforme le glucose en acide gluconique, une compétition entre le glucose et de l'insuline modifiée pour lier de la A Concanavaline (Con A), une protéine qui se lie naturellement au glucose, greffée à des chaînes de polymères ou encore une transition sol-gel réversible en réticulant le gel avec du glucose et de la Con A [54]. Bien que très prometteurs, ces systèmes sont encore loin de pouvoir être utilisés cliniquement. En effet, les réponses sont encore trop lentes pour être efficaces et les hydrogels ne reviennent pas à leurs états initiaux assez rapidement. De plus, la protéine Con A, fréquemment utilisée, peut provoquer une réponse immunitaire indésirable.

Le principe des hydrogels intelligents est donc très attrayant car ils s'adaptent et répondent eux-mêmes aux stimuli qu'ils reçoivent de leur environnement. Cependant, les polymères utilisés manquent souvent de biocompatibilité et ne sont pas toujours biodégradables. Un effort supplémentaire doit donc être produit pour résoudre ces problèmes.

2.1.2.4 Les hydrogels à effet d'affinité

La libération de protéines et peptides nécessite généralement l'utilisation d'hydrogels, les autres systèmes contrôlés ayant tendance à dégrader les protéines lors de l'encapsulation [55]. Cependant, les peptides et protéines sont souvent petits comparés à la taille des pores de l'hydrogel et la libération est donc très rapide. Pour ralentir leur libération, il est difficile d'utiliser des techniques

chimiques comme les lier de façon covalente aux chaînes du polymère puisque les conditions de réactions peuvent dénaturer les protéines (pH acide ou basique, solvant organiques, *etc*). L'utilisation d'une propriété propre aux protéines, l'affinité pour une autre protéine ou partenaire biologique, semble donc une méthode prometteuse pour le contrôle de la libération des protéines. Ces systèmes sont basés sur une interaction d'affinité entre l'hydrogel et la protéine ce qui aura pour conséquence de ralentir la diffusion et donc contrôler la libération de la protéine [55], [56]. Les systèmes d'affinité utilisés se classent en quatre catégories : une interaction entre la matrice extracellulaire (MEC) et la protéine, l'ajout d'un partenaire de liaison de la protéine sur le polymère, l'utilisation de partenaires de liaison synthétiques sur le polymère et la protéine, et enfin l'utilisation d'interactions électrostatiques (Figure 2.6).

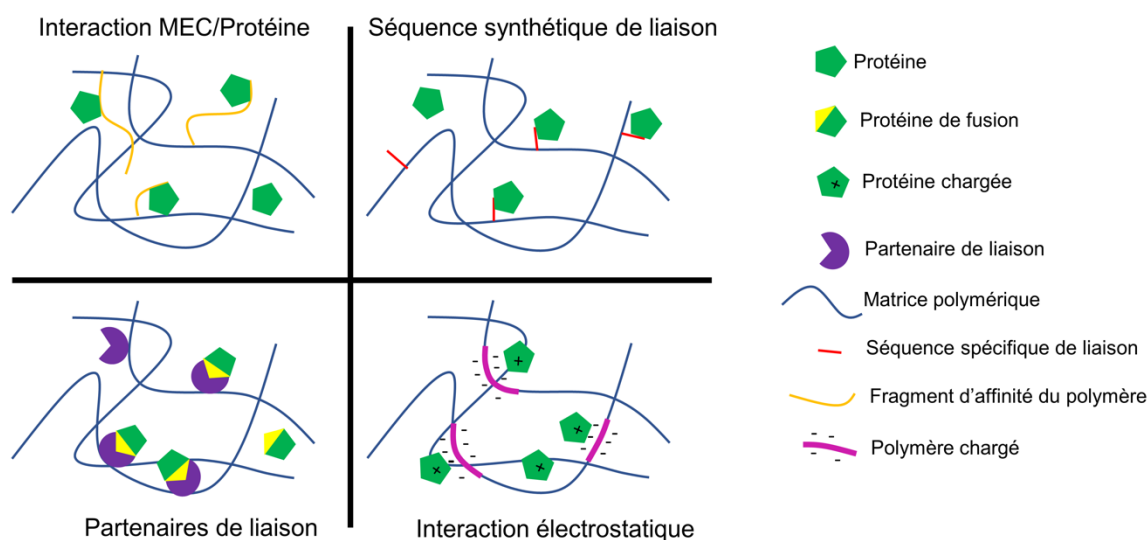


Figure 2.6 : Stratégie de contrôle de libération par affinité. Figure adaptée de [56]

La première catégorie, l'interaction directe MEC/protéine tire avantage des propriétés naturelles de la protéine que l'on souhaite administrer. Un des exemples les plus communs est l'interaction entre de l'héparine et des protéines ou peptides qui s'y lient naturellement [39], [57], [58]. Freeman *et al* ont étudié l'affinité de ces protéines pour de l'alginate modifié avec des groupements sulfate et ont montré que les facteurs de croissance VEGF, PDGF-BB et TGF β 1 se liaient à l'alginate sulfaté avec une constante de dissociation similaire à celle de l'héparine [59] et donc que la vitesse

de libération des protéines pouvait être contrôlée de cette manière [60]. De plus, la libération de ces facteurs de croissance est non seulement ralentie par rapport à l'utilisation d'alginate non modifiée mais aussi séquentielle, les constantes de dissociation étant différentes pour chaque protéine. Cela imite la cascade de signaux produite lors de l'angiogenèse. D'autres groupes ont également montré qu'une libération prolongée pouvait être obtenue en utilisant l'affinité de molécules hydrophobes pour des cyclodextrines [55], [58]. Le groupe de von Recum a étudié la libération de plusieurs antibiotiques hydrophobes, dont la rifampicine, la novobiocine et la vancomycine, par des gels de cyclodextrines [61], [62]. Les profils de libération ont montré une libération active jusqu'à 80 jours pour la rifampicine dans un tel gel. La vitesse de libération a même pu être variée en modifiant la concentration d'unité de liaison dans le dextran ainsi que son affinité pour la molécule hydrophobe.

Si la protéine n'a pas d'affinité pour des fragments de polymère, ceux-ci sont parfois modifiés avec des séquences peptidiques qui ont une affinité avec la protéine (catégorie 2). Les aptamères, des oligonucléotides synthétiques, généralement d'ARN ou d'ADN, sont capables de se fixer sur certaines protéines avec une grande spécificité et affinité. Pour cette raison, ils ont été utilisés pour contrôler la libération de protéine dans des gels. Battig *et al* ont modifié des microparticules de polystyrène avec deux aptamères, l'un capable de lier VEGF et l'autre PDGF-BB, deux facteurs de croissance [63]. Ces microparticules chargées en facteurs de croissance ont ensuite été séquestrées dans un hydrogel d'agarose. Comme les aptamères sont capables de dimériser avec une séquence complémentaire, la libération de chaque facteur de croissance a pu être déclenchée à la suite de l'ajout dans le milieu d'une séquence complémentaire de l'aptamère qui le liait. En effet, la séquence complémentaire, libre dans le milieu, va venir compétitionner le facteur de croissance et se lier à l'aptamère, libérant ainsi la protéine. De cette manière, il est possible de contrôler non seulement quelle protéine est libérée, mais également à quel moment et en quelle quantité. Des peptides capables de se lier à certaines protéines sont également fréquemment utilisés. Par exemple, Lin et Anseth ont contrôlé la libération du facteur de croissance bFGF par des hydrogels de PEG en y greffant des peptides qui lient cette protéine [64]. Ils ont également montré que le greffage du peptide avait une influence sur l'affinité de liaison et donc qu'un soin particulier était nécessaire lors de cette étape. En effet, il arrive que l'affinité de l'interaction diminue lors du greffage. Dans leur cas, conjuguer le peptide à une chaîne de polymère linéaire et l'intégrer à un hydrogel de PEG interpénétré a suffi à améliorer la force de liaison car aucun peptide n'intervenait dans la

réticulation. Cependant, il est à noter qu'une attention particulière doit être apportée dans la conjugaison des peptides aux polymères pour ne pas nuire à leur activité.

La troisième catégorie, l'ajout de fragments d'affinité sur les agents thérapeutiques et l'hydrogel, est plus complexe à mettre en place puisqu'il faut modifier à la fois le polymère et la protéine mais est aussi plus flexible. Dans ces systèmes, l'agent thérapeutique se fixe sur la matrice polymérique de façon non-covalente via des protéines ou polypeptides qui sont eux liés de façon covalente. L'association protéine-protéine se fait généralement par des interactions électrostatiques et est stabilisée par des interactions hydrophobes. En appliquant des mutations sur des acides aminés responsables de ces interactions, il est possible de modifier et moduler les constantes d'affinité et donc de contrôler la vitesse de libération. De plus, cette méthode présente l'avantage de ne pas appliquer de modifications chimiques sur la protéine d'intérêt, l'agent thérapeutiques. On ne risque donc pas de diminuer la bioactivité de la protéine d'intérêt. Vulic et Shoichet ont tiré parti de l'affinité des domaines SH3 (Src homology 3) pour des peptides riches en proline [65]. La libération du facteur angiogénique rhFGF2 exprimant un domaine SH3 a ainsi été prolongée dans un hydrogel d'acide hyaluronique modifié avec l'un de ces peptides. En utilisant des peptides avec une forte ou une faible affinité au domaine SH3, la vitesse de libération peut même être modulée. Le groupe de Heilshorn a utilisé une approche similaire pour livrer un peptide, QK, capable d'activer les récepteurs VEGF et d'induire une réponse angiogénique [66]. Pour cela, ils ont utilisé un hydrogel interpénétré (MITCH) réticulant via la liaison de domaines WW (soit 2 résidus tryptophanes) à des peptides riches en proline. En modifiant les peptides QK avec un ou deux domaines riches en proline, ils ont été capables de modifier les profils de libération du peptide. De plus, l'injection de MITCH chargé avec ces protéines a permis d'induire une prolifération cellulaire plus importante que l'injection des protéines dans une solution saline. Ce système a donc un vrai potentiel pour des applications thérapeutiques d'angiogenèse.

Enfin, le contrôle de la libération peut également se faire avec des interactions électrostatiques entre le polymère et l'agent thérapeutique. Song et al ont étudié la libération de protéines chargées, comme des facteurs de croissance nerveux, par des hydrogels formés de copolypeptides diblocs chargés négativement [67]. Ils ont montré que la libération des facteurs nerveux était prolongée lorsque la concentration de ces polypeptides augmentait. *In vivo*, leur modèle a permis une hypertrophie prolongée sur quatre semaines des neurones visés, ce qui démontre la capacité de ce modèle à être utilisé dans la barrière hémato-encéphalique. Une autre méthode consiste à utiliser

les étiquettes (His)₆ (une suite de 6 histidines) avec lesquelles les protéines sont souvent produites à des fins de purification sur une colonne de chromatographie d'affinité au nickel. Lin et Metters ont développé une matrice polymérique de PEG diacrylate couplée à des fragments d'acides iminodiacétique (IDA), fragments connus pour fixer les étiquettes (His)₆ en présence d'ions métalliques divalents comme le Cu²⁺, le Zn²⁺ et le Ni²⁺ [68]. Ils ont été capables de modifier le profil de libération (de 8h à 48h) de l'albumine de sérum bovin (BSA) par cet hydrogel en variant la concentration d'ions cuivre, mais également en variant l'affinité de l'interaction en remplaçant les ions cuivre par des nickels [69]. Cependant cette technique soulève plusieurs problèmes : la toxicité des ions cuivre, nickel et zinc est un inconvénient important pour éventuellement utiliser ce système *in vivo*. En définitive, les systèmes à interactions électrostatiques ont prouvé leur efficacité mais il s'agit encore de résoudre les problèmes de biocompatibilité et de toxicité pour une utilisation *in vivo* de certains systèmes. De plus, les protéines et agents thérapeutiques qui peuvent être délivrés doivent nécessairement être chargés ce qui limite leur utilisation.

2.2 Les peptides synthétiques d'affinité

2.2.1 Définition

Les peptides sont des hétéropolymères composés d'une suite d'acides aminés. Ces acides aminés sont liés entre eux par des liaisons peptidiques, c'est-à-dire une liaison entre le groupement carboxylique d'un acide aminé et le groupement amine α de l'acide aminé suivant. Les peptides peuvent donc être simplement définis comme de très petites protéines, la limite de taille ayant été arbitrairement définie à 6000 Da [70]. Ce sont des molécules de grande importance, notamment dans les domaines de la santé (insuline, 51 résidus, 5773 Da) et de la nutrition (Aspartame, 2 résidus). Ils sont naturellement présents dans notre corps et jouent un rôle physiologique et biologique essentiel : ils peuvent agir comme des hormones, des neurotransmetteurs, ou encore des vecteurs de molécules à travers les membranes. Il n'est donc pas étonnant que de nombreux chercheurs s'intéressent à produire des peptides et protéines pour des applications thérapeutiques ou alimentaires. Différentes technologies permettent aujourd'hui de produire ces molécules : l'extraction d'une source naturelle, la production via un ADN recombinant, la production dans des

animaux ou plantes transgéniques, la synthèse chimique, la synthèse enzymatique, *etc* [70]. En général, c'est la taille du peptide ou de la protéine qui déterminera la technique que l'on va utiliser pour la produire. Par exemple, les technologies utilisant des ADN recombinants sont pratiques pour de longs peptides ou des protéines. Cette méthode est donc souvent préférée pour produire des hormones comme l'insuline [71]. La synthèse chimique est une technique viable pour des peptides allant de 5 à 80 résidus, mais les rendements baissent rapidement lorsque le nombre de résidus augmente. La synthèse enzymatique n'est généralement pratiquée que pour des dipeptides ou tripeptides (2 ou 3 résidus) [70]. Les principaux défis de la synthèse de peptides et de protéines sont l'optimisation des rendements ainsi que l'imitation de la structure tertiaire et quaternaire des protéines, c'est-à-dire leur conformation dans l'espace, qui est essentielle à leur bioactivité.

Les différents rôles des peptides et protéines dans le corps humain ont également donné l'idée à la communauté scientifique de mettre au point de nouveaux peptides *de novo*, en s'inspirant des structures naturelles, pour des applications thérapeutiques et biotechnologiques. L'une des propriétés les plus intéressantes des peptides est leur grande affinité et spécificité pour un ligand [71]. L'affinité peut être définie comme la force avec laquelle un ligand se lie à son récepteur alors que la spécificité d'un ligand est sa capacité à se lier à un unique récepteur. Il est donc cohérent que de nombreux peptides d'affinité sont développés dans le but d'attacher des molécules ou de cibler des cellules particulières [64], [72], [73]. Le développement de peptides synthétiques est vu comme un outil performant pour mieux comprendre les fonctions, structures et repliements des protéines [74]. Ainsi, la création de nouveaux peptides et protéines s'inspirant de ceux naturels pourrait engendrer de véritables avancées dans les domaines médicaux et pharmaceutiques.

2.2.2 Les peptides superhélices

Les peptides superhélices, ou «coiled-coil», sont des peptides qui forment des motifs hélicoïdaux composés d'au moins deux hélices α s'enroulant les unes aux autres [75]. Cette structure est stabilisée par des interactions inter-hélices qui interviennent entre les groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés. La séquence primaire des peptides superhélices est caractérisée par une heptade $(abcdefg)_n$ dont le modèle se répète n fois. Comme l'hélice α comporte

3,6 acides aminés par tour, l'acide aminé en position $i+7$ est toujours placé au-dessus de l'acide aminé en position i . Cette propriété assure la répétabilité de l'arrangement spatiale des peptides et est à l'origine du caractère amphipatique de la structure (une partie hydrophile d'un côté et une partie hydrophobe de l'autre) [76]. En effet, les acides aminés en position a et d sont généralement hydrophobes et forment le cœur hydrophobe de la superhélice (Figure 2.7). Les 5 autres acides aminés sont en général hydrophiles. C'est l'arrangement des résidus apolaires dans le cœur hydrophobe qui maintient principalement la structure «coiled-coil» [77]. Mais il a été montré que des interactions électrostatiques entre des résidus de charges opposés (en position e et g) sont aussi responsables de la stabilité de la structure de la superhélice (Figure 2.7) [77].

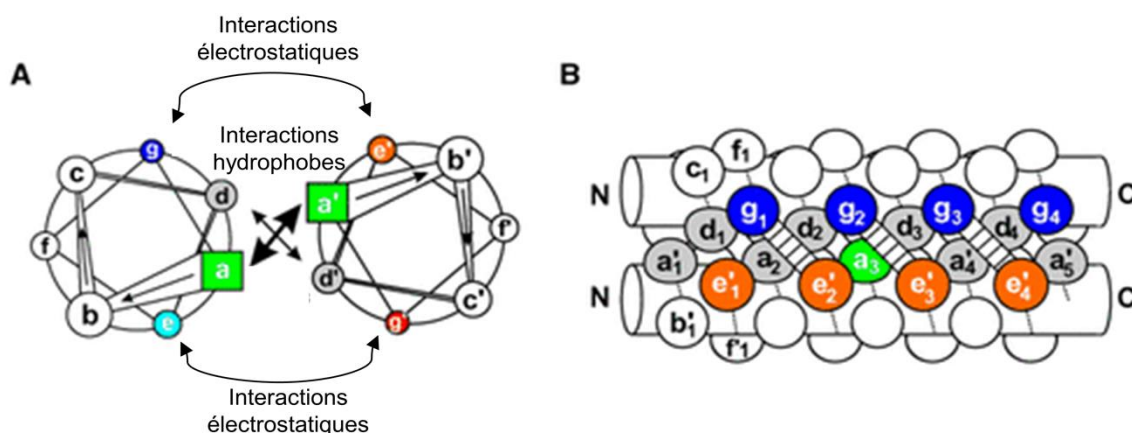


Figure 2.7 : Schéma explicatif d'un dimère ayant une structure «coiled-coil». A) Vue d'au-dessus de la superhélice. B) Vue latérale de la superhélice. Le cœur hydrophobe est représenté par les résidus a, a', d et d' entre les deux hélices α . Les interactions électrostatiques dans la séquence répétitive sont montrées entre les résidus g et e' d'une part (bleu et orange) et e et g' d'autre part (cyan et rouge). Reproduit et adapté de [78].

La structure superhélice assure, malgré sa simplicité, une grande variété de fonctions dans la nature. On la retrouve par exemple dans les cheveux, les écailles ou encore les plumes (kératine). C'est pourquoi le design de structure «coiled-coil» est aussi prometteur. Des peptides superhélices *de novo* sont donc mis au point avec des structures et propriétés bien définies pour permettre une meilleure compréhension des superhélices naturelles. Le motif superhélice pourrait également

devenir un outil polyvalent et pratique dans le domaine des biotechnologies, notamment dans la conception de matériaux et systèmes peptidiques.

2.2.3 L'hétérodimère Ecoil/Kcoil

2.2.3.1 Propriétés

Dans cette partie, nous nous intéressons à une structure superhélice particulière, celle formée par l'hétérodimérisation des peptides Ecoil et Kcoil. Ces peptides, formés de 35 acides aminés, ont été mis au point par le groupe de recherche du Pr. Hodges à l'Université d'Alberta [79]. Le peptide Ecoil est composé d'une heptade de séquence E-V-S-A-L-E-K qui se répète cinq fois, alors que la séquence de l'heptade du Kcoil est K-V-S-A-L-K-E. Ces séquences ont été choisies dans le but de répondre du mieux possible à certains critères. Parmi ceux-ci, la séquence d'acides aminés doit permettre la formation d'une hélice α et les résidus doivent être placés de façon à obtenir un cœur hydrophobe stable aux positions **a** et **d**. La superhélice est également stabilisée par des interactions électrostatiques qui sont assurées par les acides aminés appropriés en position **e** et **g**. Chaque hélice a une charge nette neutre ce qui est assuré par des acides aminés de charges opposés aux positions **f** d'une part et **e** et **g** d'autre part. Enfin, les peptides étant initialement synthétisés par synthèse chimique, la séquence d'acides aminés choisie a été optimisée de façon à obtenir de bons rendements.

Les deux peptides Ecoil et Kcoil forment donc un hétérodimère à pH neutre, avec un cœur hydrophobe composé de résidus valine (en position **a**) et leucine (position **d**). Cette combinaison est d'ailleurs très répandue dans la nature. Les interactions électrostatiques sont assurées par les résidus glutamate et lysine en position **e** et **g**. Ces acides aminés chargés ont un groupement méthyl sur leur chaîne latérale et leurs répulsions électrostatiques favorisent la formation d'hétérodimères E/K plutôt que des homodimères E/E ou K/K. Dans leurs différentes études, Chao *et al* ont montré que la superhélice formée était très stable, même en présence de plusieurs agents dénaturants et une température élevée [79], [80].

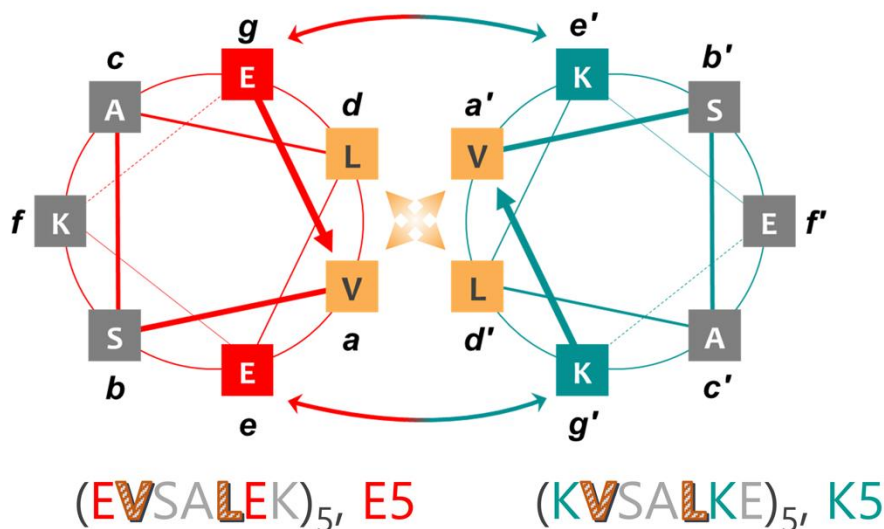


Figure 2.8 : Représentation schématique d'une heptade du Ecoil et du Kcoil et de leur organisation dans la structure superhélice. Adaptée de [6].

2.2.3.2 Applications

Le complexe Ecoil/Kcoil a été utilisé pour diverses applications dans le domaine des biotechnologies en raison de sa grande stabilité et de la forte affinité des deux partenaires (K_D de l'ordre du pM). Chao *et al* ont utilisé ce couple pour la purification de protéines. En ajoutant une étiquette Ecoil ou Kcoil sur les protéines, il est possible de purifier les protéines (des anticorps dans leur cas) par chromatographie d'affinité de manière efficace. Le complexe Ecoil/Kcoil a également été utilisé pour la préparation des surfaces des puces de biocapteurs, la dissociation du complexe étant très lente (constante cinétique de dissociation (k_d) faible) [79], [81], [82]. Dernièrement, les peptides Ecoil/Kcoil ont également été utilisés dans l'immobilisation de protéines thérapeutiques (les facteurs de croissance EGF et VEGF) orientées sur des surfaces [83]–[85] ainsi que dans le développement de nanoparticules fonctionnalisées pour la thérapie génique [86]. Enfin, une étude a également montré que ces peptides pourraient présenter un intérêt pour la libération contrôlée de biomacromolécules [7]. Toutes ces études ont montré que le champ d'application du complexe Ecoil/Kcoil est très large et elles ouvrent la porte sur d'autres domaines d'application en biotechnologie, médecine régénératrice, thérapie génique ou encore pour l'administration d'agents thérapeutiques.

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT INDIQUANT LA COHÉRENCE DE L'ARTICLE PAR RAPPORT AUX OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

L'objectif global de ce projet de recherche consistait à utiliser un système d'affinité, les peptides Ecoil/Kcoil, pour contrôler la diffusion de nanoparticules dans un hydrogel. Différentes études effectuées dans notre laboratoire ont prouvé l'efficacité du dimère Ecoil/Kcoil pour immobiliser des protéines de manière orientée sur des surfaces. Aussi, ce projet vise à étendre l'utilisation potentielle de ce dimère en prouvant son efficacité pour ralentir la libération de nanoparticules dans un hydrogel.

Pour arriver à cet objectif, des nanoparticules d'or ont été fonctionnalisées avec le facteur de croissance EGF étiqueté par le peptide Ecoil. Les nanoparticules d'or ont été choisies pour ce projet pour plusieurs raisons. La synthèse des nanoparticules est relativement facile et maîtrisée. Dans la littérature, leur fonctionnalisation via un groupement thiol est bien documentée. De plus, elles représentent un bon modèle de nanovecteurs mais ont également des propriétés intéressantes pour des applications biomédicales comme la thérapie photothermique, la radiothérapie ou encore l'imagerie. Une protéine, le facteur de croissance épidermique, EGF, est également ajoutée comme modèle. Cette protéine peut permettre le ciblage de cellules cancéreuses qui surexpriment les récepteurs EGF.

Le polymère choisi pour former l'hydrogel est l'alginate. Ce polymère naturel est largement utilisé dans des applications biomédicales à cause de sa très grande biocompatibilité. De plus, les chaînes d'alginate peuvent être fonctionnalisées avec des chimies relativement simples. L'hydrogel est formé via une réticulation avec des ions divalents, des ions calcium dans notre cas.

L'objectif était ensuite d'étudier la libération de ces nanoparticules par un hydrogel. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre 4 de ce mémoire et ont fait l'objet d'un manuscrit scientifique soumis pour publication dans le journal *Biomacromolecules* le 28 janvier 2019.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : A COILED-COIL AFFINITY-BASED SYSTEM FOR THE CONTROLLED RELEASE OF BIOFUNCTIONALIZED GOLD NANOPARTICLES FROM ALGINATE HYDROGELS

4.1 Présentation de l'article

Les systèmes d'affinité semblent être une solution prometteuse pour la livraison contrôlée de PA par des hydrogels. Nous avons ici développé un système hybride, basée sur les peptides d'affinité superhélices Ecoil/Kcoil, pour contrôler la libération de NPs d'or d'une matrice d'alginate. Les NPs d'or ont été fonctionnalisées avec un facteur de croissance épidermique (EGF) étiqueté du Ecoil. La bioactivité du EGF greffé ainsi que la biodisponibilité du Ecoil ont été confirmé par un test de phosphorylation des récepteurs EGF des cellules A431 d'une part, et par l'immobilisation des NPs fonctionnalisées sur une surface décorée de Kcoil d'autre part. Le peptide complémentaire, le Kcoil, a été greffé sur les chaînes d'alginate grâce à une chimie click mettant en jeu un azide ajouté en fin de séquence du Kcoil (Aha-Kcoil) et un alcyne préalablement greffé sur l'alginate.

Le système hybride a été formé en dispersant les NPs fonctionnalisées avec le EGF étiqueté du Ecoil dans des hydrogels d'alginate contenant 0, 10 ou 20% d'alginate modifié avec du Kcoil (Alg-Kcoil). Lorsque l'hydrogel contenait 20% d'alginate Kcoil, la libération des NPs fonctionnalisées avec le Ecoil a été réduite de moitié comparativement aux NPs simplement pegylées, alors que peu ou pas de différences dans la libération ont été notées pour 0 et 10% d'Alg-Kcoil. La microscopie différentielle dynamique a été utilisée pour déterminer les coefficients de diffusion des différentes NPs et les résultats ont montré une diminution du coefficient de diffusion des NPs fonctionnalisées avec le Ecoil comparativement aux NPs simplement pegylées.

En définitif, nos données ont montré que le systèmes Ecoil/Kcoil pouvait contrôler la libération de NPs lorsque l'hydrogel contenait une grande quantité de Kcoil. Ces résultats ouvrent la voie à de nombreuses applications pour l'application de médicaments.

4.2 Header : Biomacromolecules

A coiled-coil affinity-based system for the controlled release of biofunctionalized gold nanoparticles from alginate hydrogels

Audrey Roth¹, Frederic Murschel², Pierre-Luc Latreille², Vincent A. Martinez³, Benoît Liberelle¹, Xavier Banquy^{2}, Gregory De Crescenzo^{1*}*

*Publisher: **Nanoscale***

4.3 Author affiliations

¹Department of Chemical engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), Bio-P² Research Unit, École Polytechnique de Montréal, Montréal, QC, Canada

²Canadian Research Chair in Bioinspired materials, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

³School of Physics and Astronomy, The University of Edinburgh, Peter Guthrie Tait Road, Edinburgh, EH9 3FD, UK

4.4 Abstract

Affinity-based systems represent a promising solution to control the delivery of therapeutics using hydrogels. Here, we report a hybrid system that is based on the peptidic E/K coiled-coil affinity pair to mediate the release of gold nanoparticles from alginate scaffolds. On the one hand, the gold nanoparticles were functionalized with Ecoil-tagged epidermal growth factor (EGF). The bioactivity of the grafted EGF and the bioavailability of the Ecoil moiety were confirmed by EGF receptor phosphorylation assays and by capturing the functionalized nanoparticles on a Kcoil-derivatized surface, respectively. On the other hand, alginate chains were modified with azido-homoalanine Kcoil (Aha-Kcoil) by azide-alkyne click chemistry. The hybrid system was formed by dispersing NPs functionalized with Ecoil tagged EGF in alginate hydrogels containing either 0, 10 or 20% of Kcoil-modified alginate (Alg-Kcoil). With 20% of Alg-Kcoil, the release of Ecoil-functionalized NPs was reduced by half compared to the release of pegylated NPs, whereas little to no differences were noticed with either 0 or 10% of Alg-Kcoil. Dynamic differential microscopy was used to determine the diffusion coefficient of those NPs, and the results showed a decrease in the diffusion coefficient of Ecoil-functionalized NPs, when compared to pegylated NPs. Altogether, our data demonstrated that the E/K coiled-coil system can control the release of NPs in a high Kcoil content alginate gel, opening diverse applications in drug delivery.

4.5 Keywords

Coiled-coil, affinity, diffusion, hydrogel, gold nanoparticle, differential dynamic microscopy

4.6 Introduction

Researchers from numerous fields strive to develop systems that allow for the controlled and efficient delivery of therapeutics, especially for long-term release. A number of complementary strategies have emerged in that endeavor; they have been applied to many types of therapeutics, from hydrophobic molecules to nucleic acids, peptides and proteins. A very popular method consists in encapsulating the therapeutic agent in polymeric micro- or nanoparticles [87], [88]. Release is, in this case, governed by particle degradation and passive diffusion of the therapeutic.

The encapsulation process however tends to degrade peptides and proteins and has therefore been primarily applied to small hydrophobic molecules [55]. The incorporation of the drug in a polymeric scaffold is another frequently encountered strategy, for which the release is mainly regulated by scaffold swelling and/or scaffold degradation, be it in bulk or by surface erosion, although passive diffusion can play a significant role [89]. Affinity-based delivery strategies have recently gained a lot of interest as they may offer more versatility and can promote long-term and continuous release of drugs or proteins [55]. Indeed, by incorporating a specific biological anchor in a polymeric scaffold, the molecule diffusion can be dramatically slowed down and thus release can be stretched over a long period of time [55], [56]. These systems have been growing in number and variety, and show potential for an increasing number of applications [60], [61], [64], [66], [90].

Most affinity-based strategies thus far have relied on naturally occurring interactions between the protein or drug of interest and one of its biological partners. Glycans such as heparin and sulfates have been widely reported as a means to sequester heparin-binding proteins within scaffolds [91], which has significantly extended the duration of protein delivery up to several days [60], [92]. Similarly, complexes of β -cyclodextrins have been covalently incorporated in hydrogels to control the release of hydrophobic low molecular weight proteins [93]. Some research groups have engineered polysaccharide fragments and peptide sequences inspired by natural biomolecules to interact more specifically with the therapeutic of interest and/or to better control its delivery [94]. For instance, Lin *et al.* were able to control the release profile of a growth factor from a poly(ethylene glycol) (PEG) hydrogel by functionalizing PEG chains with affinity binding peptides [64]. Similarly, Wang *et al.* developed a competitive affinity-based system to release multiple proteins at different timepoints of the treatment [90]. More precisely, the vascular endothelial and the platelet-derived growth factors were immobilized on polystyrene microparticles using two different aptamers and then those microparticles were dispersed in a hydrogel. Protein release could then be triggered by simple incubation of a competitive aptamer sequence. Regardless, systems based on natural interactions suffer from a lack of versatility. Indeed, most designs only suit a narrow panel of therapeutic agents, given that each drug may require its own partner and specific hydrogel characteristics. Moreover, the release profiles are dictated by the thermodynamics of the interaction, which are hardly tunable for natural partners. The advances in biomolecule design and synthesis, notably by protein engineering, may offer a way to circumvent these issues and fulfill the current need for more flexibility and finer control of spatiotemporal delivery.

Coiled-coils are a ubiquitous motif found in proteins that has been discovered more than six decades ago and has been the core subject of many scientific works. The research based on *de novo* designed coiled-coil forming peptides has led to a robust knowledge of the determinants of their interactions [75], [77], [95]. The rational design of peptide sequences that feature tunable specificity, stability and oligomerization state has therefore been dramatically facilitated. It has been exploited for various tissue engineering and gene delivery applications [96], and several proteins including growth factors, transcription factors and antibodies have been grafted onto polymer-based structures thanks to coiled-coil complexes [85], [97]–[99]. Our group previously developed two *de novo* designed peptides, namely the Ecoil and the Kcoil, which design is based on the repetitions of seven distinct amino acids (a heptad). When mixed together, the peptides spontaneously form a coiled-coil heterodimeric complex, which affinity can be modulated by the number of heptads and their sequence, especially the aliphatic residues that comprise the hydrophobic core of the interaction [6], [7]. The rationale of this research was to investigate the potential of coiled-coil interactions for the preparation of novel hybrid systems, that is, hydrogels that can deliver biofunctionalized nanoparticles (*e.g.* decorated on their surface with proteins or with encapsulated drugs), at a speed that is not only dependent on particle diffusion or gel degradation but that is tuned by specific affinity interactions.

To produce such system, we developed an Ecoil-decorated nanoparticle that can interact via specific coiled-coil interaction with Kcoil-grafted hydrogel. More precisely, we report, on the one hand, the functionalization of gold nanoparticles (AuNPs) with the Ecoil peptide as well as the human epidermal growth factor (EGF) using a cysteine-tagged Ecoil-EGF chimeric protein. AuNPs are interesting candidates for their biomedical applications in cancer (radiotherapy [36] and photothermal therapy [100]), imaging and drug delivery [101]. Their surface functionalization with therapeutics or peptides is well-documented [101]. On the other hand, we report a polymeric scaffold made from alginate chains that were covalently modified with the complementary Kcoil peptide and designed to specifically interact with decorated AuNPs. Alginate gels indeed feature an excellent biocompatibility, a wide use as injectable gels and unique gelation properties [102]. The AuNPs/hydrogel system was formed by simple coincubation of the Ecoil-bearing nanoparticles with the Kcoil-modified alginate chains during gelation. Affinity-based systems have been reported for protein release from hydrogels, while nanoparticles have been entrapped within gels for delayed delivery [56], [103]. This is however the first report, to the best of our knowledge,

that combines both strategies, that is, to sequester nanoparticles within a hydrogel and to release them in a controlled fashion using a specific affinity interaction [55], [104].

The characterization of the biofunctionalized nanoparticles was carried out by dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM) and ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) as well as enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) to assess the bioavailability of both the Ecoil and EGF moieties. The impact of Kcoil concentration in the hydrogel on the diffusive properties of the AuNPs was then investigated using differential dynamic microscopy (DDM) and typical release tests. Both assays indicated that the formation of the Ecoil/Kcoil complex significantly hampered the movement of nanoparticles, and thus that this affinity-based strategy is suitable to prolong the release of NPs from hydrogels. The biological activity of the EGF moiety displayed on the NPs surfaces was also demonstrated by *in vitro* cellular assays, both prior and after their release from the hydrogels.

4.7 Experimental

4.7.1 Materials

Cysteine-tagged Ecoil-EGF (CEE) was produced in HEK 293-6E cells and purified by immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC) followed by size-exclusion chromatography, as previously described.[105] Protein concentration was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against EGF and analyzed by SDS-PAGE. Purified CEE was then stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. The azidohomoalanine-terminated Kcoil peptides (AhaGG(KVSALKE)₅, or Aha-Kcoil) were synthesized by the peptide facility at University of Colorado (Denver, CO). Untagged recombinant human EGF and ELISA kit were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Sodium alginate ($M_w = 171\text{ kDa}$) (IL-6G) were purchased from Kimica corporation (New-York, NY). Thiolated polyethylene glycol (PEG-SH) ($M_w = 5\text{ kDa}$) was obtained from Jenkem Technology (Dallas, TX). MilliQ water was generated with a Millipore Gradient A10 purification system. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and gentamicin were obtained from Gibco (Burlington, VT). 75-cm² CellBIND flasks and 48- and 96-well CellBIND plates for cell cultures were purchased from Corning (Corning, NY). All other products and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON), unless otherwise specified. Absorbance measurements were carried out on a Victor V

Multilabel Counter from PerkinElmer Inc. (Woodbridge, ON) or using a Spark® multiplate reader from Tecan Group Ltd (Männedorf, Switzerland).

4.7.2 Biofunctionalization of gold nanoparticles

4.7.2.1 Synthesis and characterization of gold nanoparticles

Gold nanoparticles (AuNPs) were synthesized using a citrate reduction method according to a previously published procedure [106]. Briefly, trisodium citrate (0.94 mL at 11.4 mg/mL) was rapidly injected in a boiling chloroauric solution (50 mL at 0.1 mg/mL in MQ water) under vigorous stirring and heating for 5 min, then cooled to room temperature (RT). The color of the solution changed from blue to deep red.

The NPs sizes were characterized by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern Zetasizer (Malvern, UK) and by transmission electron microscopy (TEM, field emission 2100F, JEOL, Tokyo, Japan). The number of gold atoms per nanoparticle (N) was estimated using

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6 M}, \quad (1)$$

where ρ is the density for face-centered cubic gold (19.3 g/cm³), M is the atomic weight of gold (197 g/mol) and D is the diameter of the NPs determined by TEM [107].

The final AuNPs concentration is given from

$$[AuNPs] = \frac{m}{M \times N \times V}, \quad (2)$$

where m is the initial mass of gold and V is the final volume of the solution. In our experimental conditions, the concentration of the pristine gold nanoparticles was 8.2×10^{11} particles/mL or 1.4 nM, and their diameter was 18 ± 2 nm according to TEM. The stock solution was used to determine the AuNPs extinction coefficient at 531 nm, i.e. $\epsilon_{AuNP} = 5.53 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, which is in good agreement with the literature for particles of this size [108]. After functionalization of the gold nanoparticles, the concentration of coated AuNPs was evaluated via UV-Vis measurements at 531 nm.

4.7.2.2 Pegylation of gold nanoparticles

After synthesis, the AuNPs were stabilized by means of decoration with a low density of thiolated polyethylene glycol (PEG-SH) ($M_w = 5$ kDa). The gold nanoparticles exposing a low density of PEG (NP-PEG_{LD}) were obtained by injecting ca. 7 μ L of PEG-SH in 20 mL of the citrate solution containing the AuNPs (final concentrations of 0.5 μ M PEG-SH and 1.4 nM AuNPs). After 16 h under stirring, the NP-PEG_{LD} were centrifuged one time ($10,000 \times g$ for 30 min) and the supernatant was discarded to remove unreacted PEG-SH.

The amount of PEG-SH on the particles was determined using a ^1H NMR-based method as previously described [109]. Briefly, PEGylated NPs (700 μ L, 5.4 nM) were digested overnight with 7 μ L of Aqua Regia solution (37% HCl and 68-70% HNO₃ in a 3:1 ratio v/v). The resulting mixture was then freeze-dried and resuspended in deuterium oxide (D₂O) to reach a final volume of 700 μ L. Acetonitrile (ACN) was used as a standard to quantify the PEG-SH concentrations, i.e. 7 μ L of 0.24% v/v ACN in water was added to each sample. The PEG-SH concentration was evaluated by calculating the ratio between the integration of two peaks at specific positions for PEG-SH (3.7 ppm) and ACN (2.06 ppm). The PEG-SH concentration of each sample was determined using a standard curve ranging from 0.1 to 200 μ M of PEG-SH.

4.7.2.3 Cys-Ecoil-EGF grafting on the pegylated gold nanoparticles

The NP-PEG_{LD} were coated with cysteine-tagged Ecoil-EGF (CEE) thanks to the thiol group displayed by the cysteine. NP-PEG_{LD} were mixed with CEE (final concentrations of 1.4 nM and 500 nM, respectively) in MQ water containing dextran chains that acted as a labware non-specific adsorption blocker (10 mg/L of pristine dextran, $M_w = 70$ kDa). The mixture was allowed to react for 16 h under gentle agitation. To enhance NPs stability, PEG-SH was then added at a final concentration of 50 μ M for 2 h to generate highly dense PEG-coated NPs (NP-PEG_{HD}). Unreacted material was removed by performing 4 centrifugations cycles ($10,000 \times g$ for 30 min). For each cycle, 1.9 mL of supernatant were discarded and the remaining 100 μ L of CEE-coated nanoparticles (NP-CEE-PEG_{HD}) were resuspended in 1.9 mL of phosphate buffered saline solution (PBS, 10 mM sodium phosphate and 150 mM of KCl/NaCl salts) supplemented with 0.1% v/v Tween-20 (PBS-T). As controls, NP-PEG_{LD} were incubated with untagged EGF or without added EGF and were subjected to the same purification and blocking procedures. The resulting NPs were

named NP-EGF-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD}, respectively. The final amount of PEG-SH grafted on NP preparations was determined using the protocol described in the previous section.

4.7.2.4 EGF quantification

Effectiveness of the CEE grafting on the NPs surface was confirmed by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against EGF. Polystyrene 96-well plates were first saturated with the growth factor overnight (16 h) using 100 μ L of 5 nM Ecoil-EGF per well. The wells were then blocked with 50 μ L of 1% w/v BSA in PBS for 1 h. In parallel, the NP samples were mixed 1:1 v/v with biotinylated anti-EGF antibodies (100 pM in PBS-T) for 1 h, while known EGF concentrations were mixed with antibodies for calibration. 50 μ L of the NPs/antibodies mixtures were then incubated in the EGF pre-coated wells for 1 h. Detection was performed by adding 50 μ L of horseradish peroxidase (HRP)-streptavidine conjugate for 20 min followed by a revelation step using 50 μ L of substrate solution. A rinsing step was performed after each incubation (3 rinsing cycles with 150 μ L of PBS-T). Absorbance was read at 630 nm and 531 nm for correction.

4.7.3 Bioadhesion of the functionalized nanoparticles

The ability of the Ecoil moiety exposed on the NP-CEE-PEG_{HD} surface to interact with its binding partner, the Kcoil, was assessed by immobilizing functionalized NPs on a Kcoil-coated surface. Kcoil-bearing dextran surfaces were prepared in 96-well plates as previously described [85]. Functionalized wells were first blocked with BSA (1% w/v in PBS, 100 μ L/wells) for 1 h. The NP-CEE-PEG_{HD}, NP-EGF-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD} were then injected at a concentration of 140 pM of particles for 1 h. The immobilized NPs were detected using an ELISA against EGF, thanks to a protocol adapted from a previously reported work [110]. Briefly, 50 μ L of biotinylated anti-EGF antibodies were added during 30 min. Detection and rinsing steps were carried out as described in the previous section.

4.7.4 Kcoil grafting on alginate

Kcoil peptides were covalently grafted on alginate via an alkyne-azide click chemistry. Sodium alginate (1.5 g) was first dissolved in 10 mL of 0.5 M NaOH. 6.5 mL of undiluted glycidyl propargyl ether (GPE, 90+% purity) was added and the mixture was allowed to react at RT under

agitation for 24 h. The product was then dialyzed (cut-off of 8 kDa) against MQ water for 72 h, freeze-dried and stored at 4 °C until use.

The azide-terminated Kcoil (Aha-Kcoil) was then grafted on the GPE-modified alginate (Alg-GPE). 100 mg of Alg-GPE were dissolved in 10 mL of MQ water with final concentrations of 1 mM of Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine (THPTA), 2.5 mM of copper sulfate (CuSO_4) and 5 mM of sodium ascorbate. Aha-Kcoil was added at an azide:alkyne ratio of 1:40. The mixture was then allowed to react at RT for 48 h under agitation and in the dark. Note that after 24 h of reaction time, 500 μL of 100 mM sodium ascorbate in MQ water was added in the mixture. Two ultrafiltration cycles in a 100 mM EDTA solution followed by three cycles with MQ water were carried out using Amicon centrifugal filter (cut-off of 5 kDa). The polymer was then freeze-dried and stored at 4 °C until use.

The amount of grafted Kcoil per alginate chain was evaluated by a 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS) assay which allows a quantification of the amines on the peptides. The assay protocol was adapted from previous work [111], [112]. Briefly, alginate-Kcoil was diluted at 4 mg/mL in sodium bicarbonate (100 mM, pH 8.5). 100 μL of the solution was mixed with 50 μL of TNBS (0.01% w/v in sodium bicarbonate, 100 mM, pH 8.5) in a 96-well plate. After 2 h at 37°C, 50 μL of sodium dodecyl sulfate (10% w/v in MQ water) and 25 μL of MQ water were added to each well. The absorbance was read at 340 nm and 630 nm for reference. A calibration curve was plotted using known concentration of glycine (range between 4 and 125 μM) and the molar extinction coefficient was corrected by the one for the amine of the lysine side-chain ($\epsilon_{\text{glycine}}=13400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [111] and $\epsilon_{\text{lysine}}=12000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

4.7.5 NP release from alginate matrix

For the NPs release studies, NPs solutions in PBS were mixed with alginate in a 1:1 ratio. More precisely, 8.1 nM of NP-CEE-PEGHD and NP-PEGHD were mixed with solutions containing 80-90% w/w of unmodified alginate plus 10% w/w of GPE-modified, 10% w/w of Kcoil-modified or 20% w/w of Kcoil-modified alginate (resp. Alg-Kcoil0%, Alg-Kcoil10% and Alg-Kcoil20%) for a total of 2% w/v of alginate in water. 50 μL of the mixture (alginate and NPs) were poured in a 96-well plate and gels were formed by adding 50 μL of CaCl_2 (0.1 M in water) for 1 h. CaCl_2 was then removed and gels were incubated in 200 μL of PBS at RT and under mild agitation (20 RPM). At each timepoint (0, 2, 4, 6, 9, 24 and 72 h), gels were removed from the wells and dissolved with

20 μL of sodium citrate (350 μM). Final volumes were adjusted to 110 μL and the concentration of NPs within the samples was determined by absorbance at 531 nm.

4.7.6 Dynamic differential microscopy (DDM)

NP-CEE-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD} were mixed with Alg-Kcoil10%, Alg-Kcoil20% or MQ water in an equal volume (final concentration of 8.1 nM of nanoparticles and 1% w/v of alginate). 180 μL of the mixtures were injected in 0.4-mm thick glass capillaries (Vitrocom, Canada). Capillaries containing alginate were opened on both ends and incubated in a CaCl_2 solution (20 mM) for 24 h for complete gelation to occur. All capillaries were sealed using petroleum jelly prior to DDM experiments [113]. DDM is a correlation-based microscopy technique that enables the characterisation of particle dynamics in complex systems [114]–[116]. Full details about DDM analysis can be found elsewhere [117]–[119] and only an overview is presented below.

Videos were recorded at 100 frames per second for 41 seconds using an upright bright-field microscope (Olympus BX81) equipped with a high acquisition-speed camera (Hamamatsu Orca-Flash 4.0 V3) and a 20X magnification phase contrast objective (Olympus Plan Ph1, NA = 0.4). From those movies, power spectrums of the difference between all pairs of images (separated by the same delay time τ) were calculated and averaged yielding the averaged Differential Image Correlation Function $g(\vec{q}, \tau)$. For isotropic motion the azimuthal average was calculated, giving $g(q, \tau) = \langle g(\vec{q}, \tau) \rangle_{\vec{q}}$ with q being the spatial frequency, which under appropriate imaging conditions [117]–[119] is related to the intermediate scattering function $f(q, \tau)$ probing for particle dynamics so that:

$$g(q, \tau) = A(q)(1 - f(q, \tau)) + B(q), \quad (3)$$

where $A(q)$ is the amplitude signal and $B(q)$ the background noise. Fitting $g(q, \tau)$ with appropriate models of $f(q, \tau)$ can access particle dynamics. We used a generalized exponential:

$$f(q, \tau) = e^{-\left(\frac{\tau}{\tau_R}\right)^\beta} \quad (4)$$

where τ_R is the relaxation time and β is an exponent that provides insight about size polydispersity of particles and their interactions. For monodisperse non-interacting spheres in water, $\beta = 1$ and

the relaxation time is $\tau_R = \frac{1}{q^2 D}$, with D being the diffusion coefficient from which the particle radius, r , can be extracted following the Stoke-Einstein equation:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

with kT the thermal energy and η the viscosity. $\beta < 1$ usually indicates size polydispersity and/or interactions, be it particle/particle or particle/gel interactions. We found that β was between 0.9 and 1 both in water and in the alginate gels, suggesting that interactions were negligible. We verified that the relaxation times τ_R were proportional to q^{-2} , therefore an effective diffusion coefficient D could be extracted from $\tau_R = q^{-2}D^{-1}$.

4.7.7 In vitro cell assay

4.7.7.1 Cell culture

A431 cells overexpressing the EGF receptor were maintained in 75-cm² flasks using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% v/v of fetal bovine serum (FBS) and 0.1% v/v of penicillin-streptomycin. The flasks were kept in a humidified incubator (37 °C, 5% CO₂) until 85-90% confluence.

4.7.7.2 Phosphorylation assay by Western Blot

A431 cells were distributed in 48-well plates at a concentration of 0.6×10^6 cells/mL (0.5 mL per well). 20 h later, 85-90% of confluence was reached and each well was rinsed 2 times with 1 mL of PBS. Cells were then starved for 3 h using 500 μ L of basal medium (DMEM with no serum). The basal medium was removed from each well and the cells were exposed during 5 min to 50 μ L of the functionalized NPs (at an equivalent EGF concentration of 1.5 nM, according to ELISA) or to 50 μ L of soluble EGF (EGF concentrations of 0.1, 1 and 10 nM). The wells were washed twice with 1 mL of PBS supplemented with 1 mM of sodium-orthovanadate, and the cells were then lysed using 75 μ L of a commercial lysis buffer supplemented with 0.1 mM of sodium-orthovanadate. Insoluble materials were removed by centrifugation ($10,000 \times g$, 20 min, 4 °C). Samples were then analysed for phosphotyrosine levels by Western Blot, using mouse PY99 (Santa Cruz, CA) and anti-mouse-HRP antibodies, according to a previously-reported procedure [120]. A Bradford assay was performed prior to gel electrophoresis to ensure that the same amount of protein

was loaded in each well. A ChemiDoc system (Biorad, Hercules, CA) and the ImageLab software were used to image the nitrocellulose membrane and to analyse images, respectively. Quantification of the level of phosphorylation in each well was enabled by the *Quantity tools* of the software, using the signal obtained with soluble EGF (10, 1 and 0.1 nM) as a calibration.

4.8 Results and discussion

We here report the engineering of an affinity-based system for the controlled release of biofunctionalized NPs from a hydrogel, using the high-affinity E/K coiled-coil interactions. This strategy makes use of AuNPs decorated with cysteine-tagged Ecoil-EGF (CEE) and of Kcoil-derivatized alginate hydrogels. AuNPs were stabilized through PEGylation, both before and after CEE functionalization (Figure 4.1.A), while the Kcoil peptide was grafted on the alginate chains using GPE-mediated alkyne:azide click chemistry (Figure 4.1.B). We here investigated the diffusive properties of the Ecoil-NPs as a function of Kcoil density in alginate hydrogels (Figure 4.1.C).

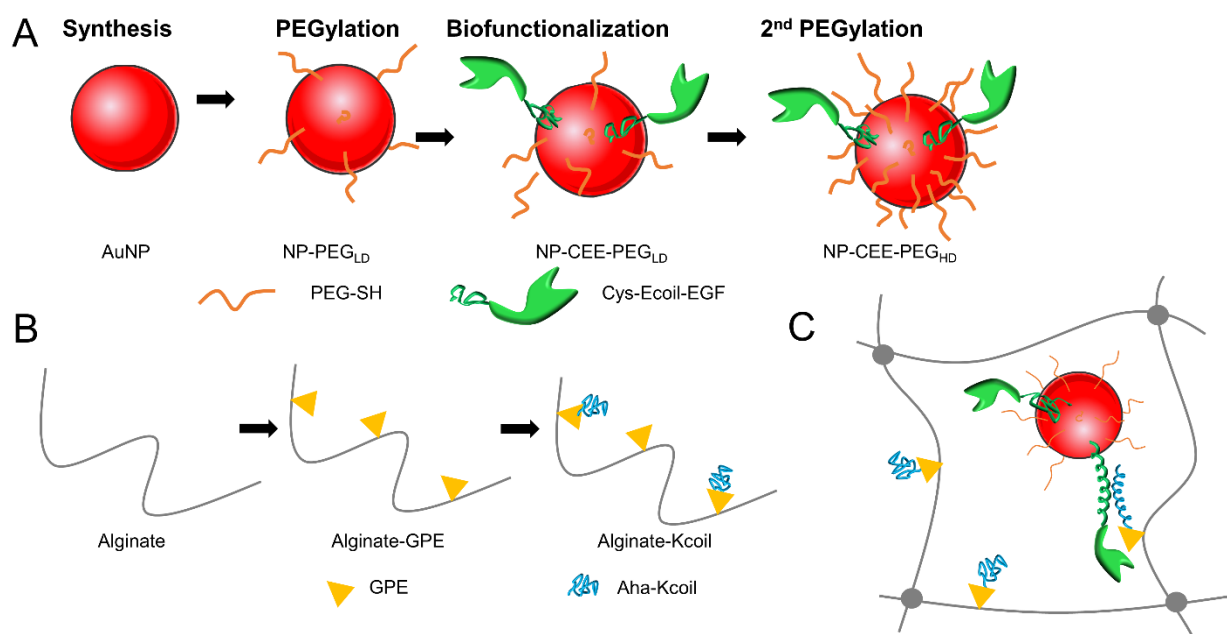


Figure 4.1 : Preparation of the affinity-based hybrid system using gold nanoparticles and an alginate scaffold. (A) AuNPs were first PEGylated to a low level for stabilization. Cys-Ecoil-

EGF (CEE) was then grafted via thiol-gold chemistry. A second PEGylation step was then performed for higher stability. (B) Alginate chains were first derivatized with an alkyne moiety using glycidyl propargyl ether (GPE). Azidohomoalanine-tagged Kcoil peptides (Aha-Kcoil) were then grafted via azide-alkyne click chemistry. (C) The dispersion of Ecoil-AuNPs in the Kcoil-alginate hydrogel enabled the formation of the E/K coiled-coil complex to slow down NPs release.

4.8.1 Characterization of pristine and functionalized NPs

Pristine and functionalized gold nanoparticles (AuNPs) were characterized using transmission electron microscopy (TEM) to determine NPs core diameter, dynamic light scattering (DLS) and differential dynamic microscopy (DDM) for hydrodynamic diameter, ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) for PEG density, enzyme-linked immunosorbent assays for EGF density and UV-Vis spectroscopy. The data are shown in Table 4.1 and Figure 4.2.

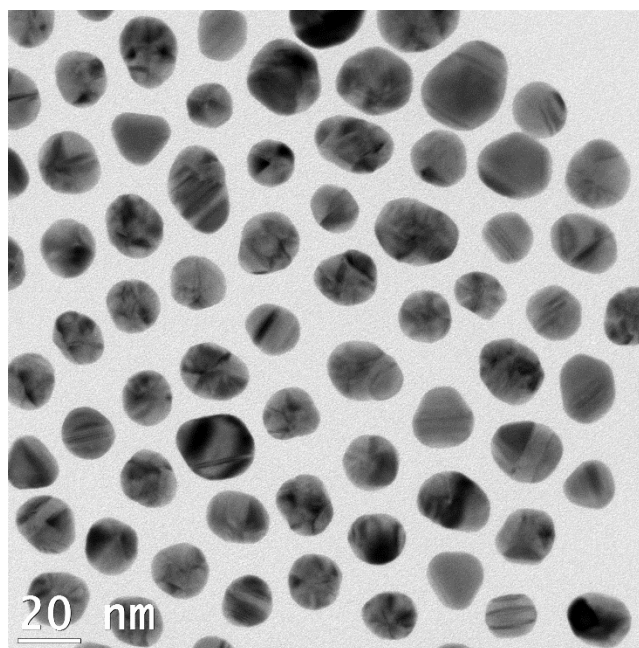


Figure 4.2 : Transmission electron microscopy (TEM) image of AuNPs.

The average NPs diameter measured was 18 ± 2 nm ($n=100$).

DLS analysis indicated that the average hydrodynamic diameter of the synthesized AuNPs was $d_{h, DLS} = 28 \pm 0$ nm with a polydispersity index of $PDI = 0.29 \pm 0.00$. Throughout the functionalization process (PEG then CEE then PEG again), the PDI of each NPs type did not significantly change ($PDI = 0.29 \pm 0.01$, 0.31 ± 0.02 and 0.29 ± 0.00 for NP-CEE-PEG_{HD}, NP-EGF-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD} respectively). The hydrodynamic diameter of NP-PEG_{LD} was $d_{h, DLS} = 55 \pm 3$ nm, that is, the first PEGylation step induced an increase in diameter of 27 nm, which is in good agreement with the literature [121]. After CEE grafting and a second PEGylation step, the NPs size further increased to reach $d_{h, DLS} = 62 \pm 2$ nm. The increase in size (7 nm) between NP-PEG_{LD} and NP-CEE-PEG_{HD} indicated that the first low-density PEG layer allowed for both stabilization and subsequent functionalization. NPs sizes were also determined by DDM. The diffusion coefficient of each type of NPs was first measured in water. NPs sizes were calculated using the Stokes-Einstein equation (Eq. 5) from the measured NPs diffusion coefficient D . The sizes of NP-CEE-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD} obtained using DDM were close to the values previously determined with DLS (cf. Table 1), while the gap between both techniques can be attributed to a different analysis of the intermediate scattering function (ISF) to take into account polydispersity effects [117], [122]. For the NP-PEG_{LD}, the average number of PEG chain per NP was calculated at $\sigma_{PEG} = 0.2 \pm 0.1$ thousands of PEG chains. Of interest, NP-PEG_{HD} particles had an average number of PEG per NP of $\sigma_{PEG} = 2.6 \pm 0.8$ whereas NP-CEE-PEG_{HD} and NP-EGF-PEG_{HD} featured dramatically less PEG chains per particle ($\sigma_{PEG} = 0.8 \pm 0.3$ and $\sigma_{PEG} = 0.5 \pm 0.0$, respectively), which suggested that the grafting of the protein on the NP surface hampered the grafting of PEG chains during the second PEGylation step.

The impact of the different functionalization on the NPs physical characteristics was also assessed by UV-vis spectroscopy. A significant 4-nm increase in the maximum absorbance wavelength λ_{max} was observed between the NP-PEG_{LD} and the fully functionalized NPs. A competitive ELISA was developed to determine the average number of EGF protein per NP (corresponding to the EGF concentration divided by the NPs concentration). The EGF density, σ_{EGF} , was found to be null (0.0 ± 0.0) for the pegylated NP-PEG_{HD}, whereas σ_{EGF} reached 1.0 ± 0.6 for NP-CEE-PEG_{HD}. Interestingly, a similar density of $\sigma_{EGF} = 1.2 \pm 0.0$ protein per particle was also obtained for NPs that were incubated with untagged EGF (NP-EGF-PEG_{HD}). For this sample, the link between untagged EGF and the NP-PEG_{LD} could be attributed to the EGF disulfide bonds interacting with the gold surface, as previously proposed by Song *et al* [123].

Tableau 2 : Characteristics of bare and functionalized gold nanoparticles.

	AuNP	NP-PEG_{LD}	NP-CEE-PEG_{HD}	NP-EGF-PEG_{HD}	NP-PEG_{HD}
λ_{max} (nm)^a	524	524	528	528	528
$d_{h,DLS}$ (nm)^b	28 ± 0	55 ± 3	62 ± 2	64 ± 2	59 ± 2
PDI^c	0.29 ± 0.00	0.28 ± 0.00	0.29 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.00
$d_{h,DDM}$ (nm)^d	-	-	53 ± 2	-	47 ± 0
σ_{PEG} (×10³)^e	-	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.3	0.5 ± 0.0	2.6 ± 0.8
σ_{EGF}^f	-	-	1.0 ± 0.6	1.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0

^a Peak absorbance wavelength^b Hydrodynamic diameter determined by DLS (Intensity distribution, mean ± SD, n = 3)^c Polydispersity index determined by DLS (Mean ± SD, n = 3)^d Hydrodynamic diameter determined by DDM (Mean ± SD, n = 5)^e Number of PEG chains per NP (Mean ± SD, n = 3)^f Number of EGF per NP (Mean ± SD, n = 3)

4.8.2 Bioadhesion and bioactivity of the functionalized AuNPs

The ability of the Ecoil moiety present at the NP-CEE-PEG_{HD} surface to interact with its biological partner, the Kcoil peptide, was assessed by incubating the functionalized NPs on Kcoil-decorated multiwell plates. After incubation, the immobilized NP-CEE-PEG_{HD} were detected using an HRP-labelled anti-EGF antibody. The ELISA data showed a significantly higher signal for NP-CEE-PEG_{HD}, when compared to NP-EGF-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD} for which no signal above the noise level was detected (Figure 4.3.A). The results thus confirmed that a) the Ecoil tag was necessary for NP capture on Kcoil-decorated surfaces and that b) the Ecoil moiety was bioavailable, i.e. both accessible and functional, on the NP-CEE-PEG_{HD}.

As for the EGF moiety on the NP-CEE-PEG_{HD} surface, its biological activity was evaluated by the ability of the growth factor to bind to its cognate receptor (EGFR) and induce EGFR phosphorylation. For that purpose, A431 cells were selected as they are known to express high levels of EGFR [124]. The cells were amplified in DMEM containing 10% v/v FBS until 80-90 % confluence. After a 3 h period of starvation in serum-free medium, the cells were stimulated with either soluble EGF (0 to 10 nM) or functionalized NPs (apparent EGF concentration of 1.5 nM according to ELISA results). The cells were then lysed, cell debris were removed by centrifugation and the amount of phosphorylated EGFR was quantified by Western Blot using an antiphosphotyrosine antibody. The EGFR phosphorylation levels were compared to control soluble EGF at concentrations ranging between 0 to 10 nM. Results show (Figure 4.3.B) that NP-CEE-PEG_{HD} and NP-EGF-PEG_{HD} were able to induce a higher level of EGFR phosphorylation when compared to soluble EGF. More precisely, when the NP-CEE-PEG_{HD} and NP-EGF-PEG_{HD} particles were diluted to obtain a 1.5 nM concentration of EGF (as determined by ELISA), the phosphorylation levels, that is, the degree of cell stimulation, were close to those obtained with a soluble EGF concentration of 5 ± 2 nM and 13 ± 2 nM, respectively. Of interest, no signal was obtained with NP-PEG_{HD} particles, which confirmed that EGF-free NPs did not induce EGFR phosphorylation. The apparently higher biological activity of the NP-tethered EGF could be the result of the high proximity of the growth factors on the surface of the particles. Indeed, two proximate EGF are known to promote EGFR dimerization and increase the phosphorylation level compared to their isolated counterparts [125].

As for the difference between NP-CEE-PEG_{HD} and NP-EGF-PEG_{HD}, it was previously shown that the addition of a Cys-Ecoil N-terminal tag to EGF did not alter the biological activity of the protein in solution [105]. The noticeable difference in EGFR phosphorylation levels obtained with the particles decorated with EGF and CEE could thus be attributed to a higher bioavailability (for instance a better orientation of the EGFR binding site) of EGF on the NP surface, when compared to CEE. The other possible explanation is that the Ecoil, in its random conformation, interacts with EGF binding site decreasing its affinity to its receptor.

Altogether, the phosphorylation assay demonstrated that both cysteine-Ecoil-tagged EGF and untagged EGF grafted on NP-PEG_{LD} were bioactive, and that their immobilization on NP surface did enhance their biological activity. Nonetheless, since our goal is to control the release of NPs

via the Ecoil/Kcoil interaction, NP-CEE-PEG_{HD} were selected for further characterization given that NP-EGF-PEG_{HD} could not interact with Kcoil-modified surfaces (cf. Figure 3.A)

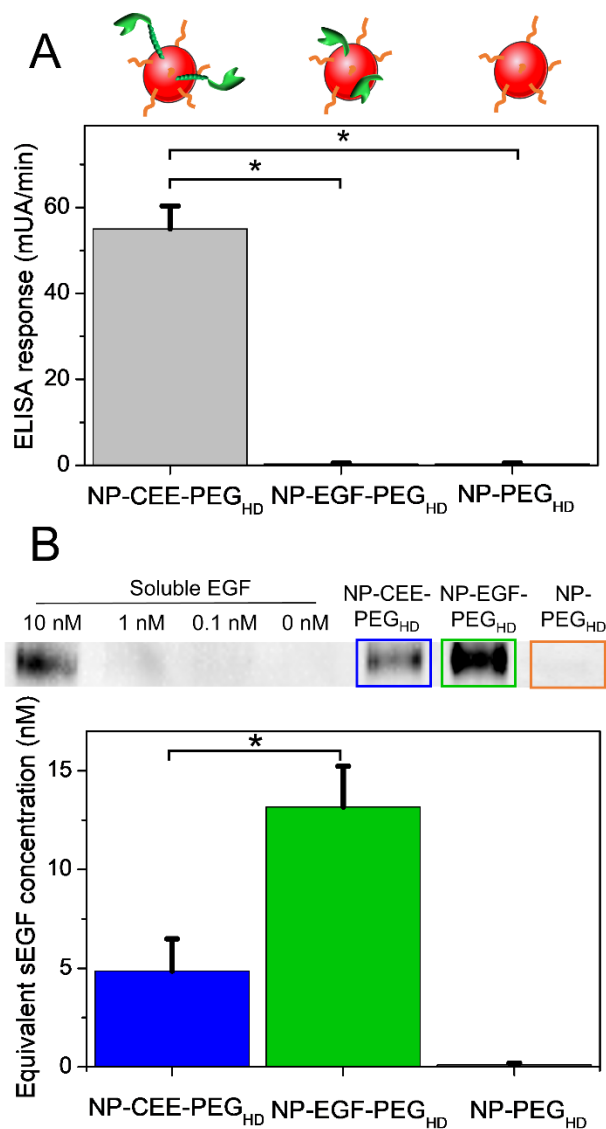


Figure 4.3 : Bioadhesion and bioactivity of functionalized NPs.

(A) Bioadhesion on a Kcoil-derivatized surface of NP-CEE-PEG_{HD}, NP-EGF-PEG_{HD}, and NP-PEG_{HD} as control, as detected by anti-EGF ELISA (n=3) (B) EGFR phosphorylation in A431 cells upon binding with soluble EGF (10, 1, 0.1 and 0 nM), NP-CEE-PEG_{HD} or NP-EGF-PEG_{HD} (EGF concentration of 1.5 nM according to ELISA) and NP-PEG_{HD}, as monitored by Western Blot. The 180-kDa band immunoreactive to anti-phosphotyrosine antibodies (corresponding to EGFR) was quantified using a ChemiDoc and Image Lab software. Y-axis represents the

equivalent concentration in soluble EGF (sEGF) ($n = 3$ for NP-CEE-PEG_{HD} and NP-EGF-PEG_{HD} and $n = 1$ for NP-PEG_{HD}, * indicates statistical differences between datasets (bilateral t-test, $p < 0.05$).

4.8.3 Characterization of Kcoil grafting on alginate

Kcoil peptides were grafted on the alginate chains using a two-step method, as illustrated in Figure 4.4. First, alkyne moieties were conjugated to alginate chain using glycidyl propargyl ether (GPE). L-azidohomoalanine (Aha)-terminated Kcoil was then covalently grafted to the polymer using alkyne-azide click chemistry [126]. In the present experimental conditions, the molar ratio was set to 1 Aha-Kcoil for 40 alkyne groups.

The alkyne ratio per chain was first quantified by ¹H NMR (Figure 4.4). A peak distinctly appeared at 3.4 ppm (peak A) after the alginate/GPE reaction and was attributed to the proton of the alkyne group. Using the peaks at 5.1 and 5.5 ppm as references (peaks M1 and G1, respectively, that were attributed to protons held by each alginate monomer) [127], we calculated that 29% of the alginate monomers were modified with an alkyne group.

As for the subsequent Kcoil grafting step, the amount of peptide per alginate monomer was evaluated thanks to the TNBS-based amine quantification test. Knowing that 1 Kcoil peptide holds 10 primary amine groups, the TNBS assay revealed that 77 % of the peptides in the alginate-GPE/Aha-Kcoil mixture reacted with alkyne groups. The yield of this click reaction is in good agreement with previous reports that used Aha and alkyne reactive groups [126], [128], [129]. Altogether, the 171-kDa alginate chains hold an average of 5 Kcoil peptides distributed among the 940 monomers.

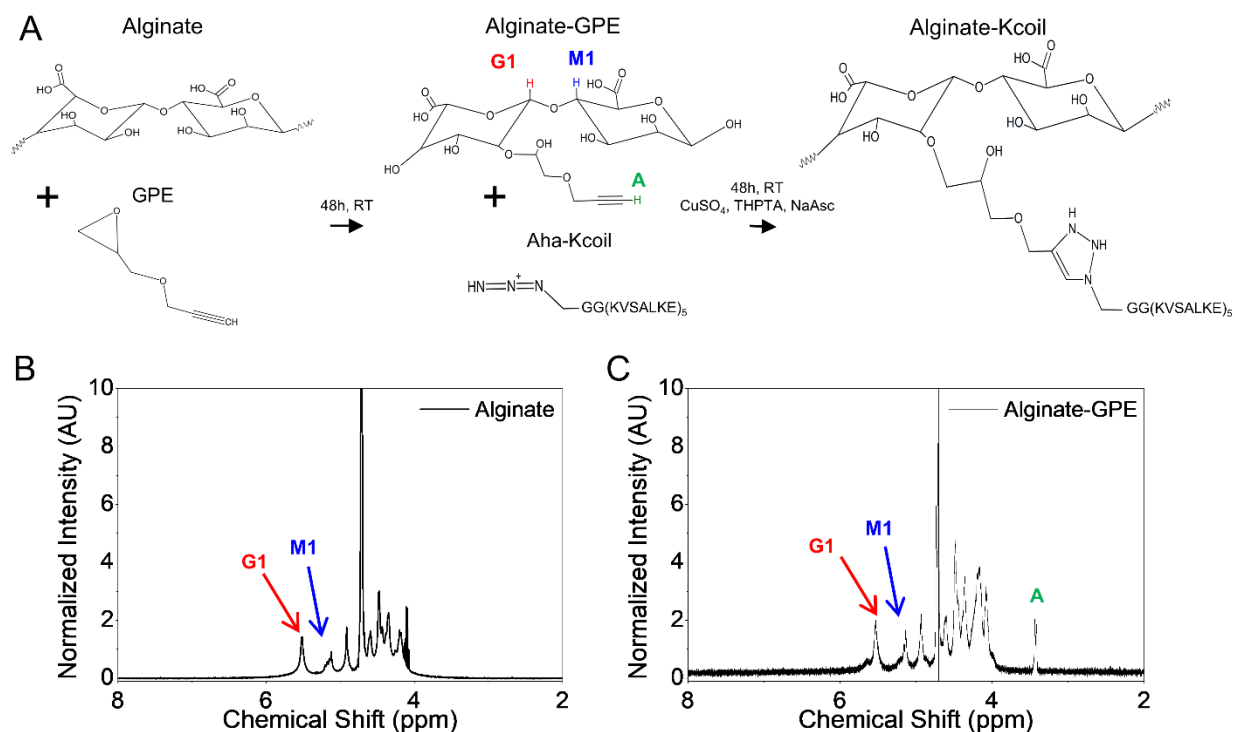


Figure 4.4 : Synthesis and characterization of Kcoil-derivatized alginate.

(A) Alginate was first modified with glycidyl propargyl ether (GPE). Azide-terminated Kcoil peptides were then grafted on alginate-GPE via alkyne-azide click chemistry in presence of copper sulfate. (B and C) The percentage of alkyne-modified monomers was quantified by ¹H NMR using the peak at 3.4 ppm (peak A), corresponding to the alkyne, and the peaks at 5.5 ppm (G1) and 5.1 ppm (M1) as reference, corresponding to the total amount of monomers.

4.8.4 Diffusion and release tests

4.8.4.1 Diffusion of the functionalized NPs

The diffusion of functionalized and pegylated NPs in alginate gels was investigated by DDM. Solutions of 2% w/v alginate containing either 10% or 20% w/w of Kcoil-modified alginate were mixed in a 1:1 (v/v) ratio with 16.3 pM of either NP-CEE-PEG_{HD} or NP-PEG_{HD}. The mixtures were injected in capillaries opened on both ends and were then immersed in a solution of 20 mM CaCl₂, which initiated the gelation by diffusion of Ca²⁺ ions. After 24 h, videos were taken at 100

fps for 41 s and the results are shown in Figure 4.5. Intermediate scattering functions (ISFs) $f(q, \tau)$ were extracted from the autocorrelation function as described above. In the case of Alg-Kcoil10%, a second slower dynamic process was observed, that was presumably due to a slow gel drift or the presence of a few aggregates as observed from the recorded videos. For such cases, we used a double generalised exponential model (from equations 3 and 4) for the ISFs when fitting the DICF $g(q, \tau)$:

$$g(q, \tau) = A_1(q)(1 - f_1(q, \tau)) + A_2(q)(1 - f_2(q, \tau)) + B(q) \quad (6)$$

where indices 1 and 2 respectively correspond to the short-time (NPs contribution) and long-time (aggregate/drift contribution) processes. We only considered the short-time diffusion coefficients in what follows.

In Figure 4.5.A, we express the evolution of the ISF $f(q, \tau)$ as a function of the relaxation time τ_R rescaled with the spatial frequency q^2 to give insight of the dynamic process. This rescaling makes the ISFs quantitatively comparable over variable q -ranges for all media considered, when considering diffusive process with $D = q^{-2} \tau_R^{-1}$. These functions show the same dynamic processes for NP-CEE-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD} that decorrelate at $\tau_R q^2 \sim 0.11 \text{ s}/\mu\text{m}^2$ ($D \sim 8\text{-}9 \mu\text{m}^2/\text{s}$) in water and at $\tau_R q^2 \sim 0.71 \text{ s}/\mu\text{m}^2$ ($D \sim 1.3\text{-}1.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$) in Alg-Kcoil10%. However, in Alg-Kcoil20%, ISFs corresponding to NP-CEE-PEG_{HD} or NP-PEG_{HD} do not overlap, indicating different diffusion coefficient. In all cases, the stretching exponent, β , was found between 0.9 and 1, which implies that no significant interaction between the NPs and the gels were observed in DDM.

From ISFs, τ_R values were extracted to determine the diffusion coefficient of the NPs in both Alg-Kcoil10% and Alg-Kcoil20% gels. Diffusion coefficients D were found independent of q , suggesting a diffusive motion within alginate gels as depicted in insets of Figure 4.5.A. The ratios between diffusion coefficients of NPs measured in the gels, D , and in water, D_w , are presented in Figure 4.5.B.

In Alg-Kcoil10%, no difference in D/D_w was observed between NP-CEE-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD}: both diffusion coefficients decreased to *ca.* 14% of the value that was obtained in water. Interestingly, for NP-PEG_{HD}, the D/D_w ratio increased from 0.15 ± 0.01 in Alg-Kcoil10% to 0.39 ± 0.07 in Alg-Kcoil20%. This could be due to differences in the structural properties of the

hydrogels. Indeed, Alg-Kcoil20% has a higher concentration of unreacted hydrophobic alkyne and amphipathic Kcoil moieties than Alg-Kcoil10%.

A significant difference between particles was nonetheless observed in Alg-Kcoil20%, where the D/D_w of NP-CEE-PEG_{HD} was found to be significantly lower than NP-PEG_{HD} (D/D_w of 0.25 ± 0.01 and 0.39 ± 0.07 , respectively). This observation demonstrates that NP-CEE-PEG_{HD} were slowed down by a factor of 4 in Alg-Kcoil20% when compared to water, as opposed to a factor of *ca.* 2.6 for NP-PEG_{HD}. The data thus demonstrated that the specific interaction between Kcoil (with sufficient concentration) and Cys-Ecoil-EGF had a significant impact on the diffusive properties of nanoparticles.

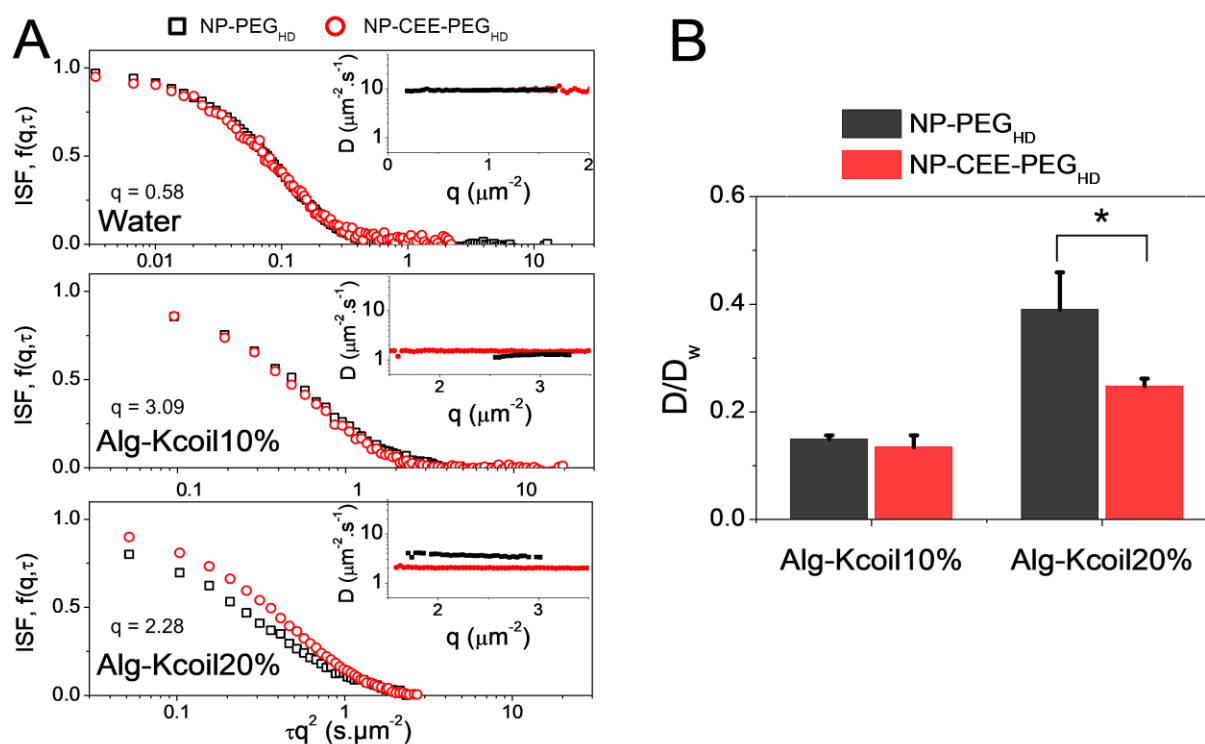


Figure 4.5 : Diffusive properties of NPs assessed by differential dynamic microscopy. (A) Intermediate scattering function $f(q, \tau) = \exp(-(\tau/\tau_R)\beta)$ of NP-CEE-PEG_{HD} (red circles) and NP-PEG_{HD} (black squares) in water, Alg-Kcoil10% and Alg-Kcoil20%. In Alg-Kcoil10%, ISF were calculated using a double exponential as in Eq.6. Insets represent the coefficient diffusion D (averaged from 5 videos) vs q for each type of NPs. Different q -values were used for each medium to best represent the short-time plateau and the long-time plateau of the ISF. (B) Diffusion

coefficients of NP-CEE-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD}, as determined by DDM. The Y-axis represents the ratio between the coefficients of diffusion of NPs in the hydrogels, D , and in water, D_w . * indicates statistical differences between datasets ($n = 5$) (bilateral t-test, $p < 0.05$).

4.8.4.2 NPs release from biofunctionalized hydrogels

The diffusive properties of the particles in hydrogels were further investigated in release studies. NP-CEE-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD} particles were added to a 1% (total w/v) alginate solution containing 80-90% (w/v) of unmodified alginate supplemented with 10% of Alg-GPE, 10% of Alg-Kcoil or 20% of Alg-Kcoil, respectively referred to as Alg-Kcoil0%, Alg-Kcoil10% and Alg-Kcoil20%. The solutions were poured in multiwell plates and gelled by the addition of CaCl₂ for 1 h. After gel formation, each gel was incubated in PBS. The concentration of AuNPs that were released in the incubation medium was indirectly assessed at different timepoints by measuring the number of NPs still entrapped in the hydrogels (Figure 4.6).

As a starting point, we observed the release profiles of NP-PEG_{HD} in different alginate medium. We found that their release was slightly affected by the gel composition, where the higher the Kcoil concentration was (from 0% to 10% and to 20%), the faster the NP-PEG_{HD} particles were released. This increase in release rate was observed since the first day, with respectively 68.4, 78.7 and 86.0% of NP-PEG_{HD} released after 24 h, in qualitative agreement with the DDM results (Figure 4.5). As mentioned, we ascribe this difference by the presence of Kcoil and/or the unreacted alkyne moieties altering the structural properties (porosity) of the gel. Indeed, chains pending from the alginate skeleton can affect crosslinking by preventing the alignment of the alginate chains and thus the formation of the so-called “egg box” structure by which alginate crosslinks with calcium cations [130].

For NP-CEE-PEG_{HD}, the general trend observed in the release profile studies was opposite to the one obtained with NPs that bore PEG moieties only. Indeed, there was no increase of NP-CEE-PEG_{HD} release from Alg-Kcoil0% to Alg-Kcoil20% during the first 9 h. Moreover, after 24 h on, the fraction of NP-CEE-PEG_{HD} that was retained inside the gels was significantly higher in the Alg-Kcoil20% hydrogel than in hydrogels with lower Kcoil content. More precisely, 42 ± 3 % of the NP-CEE-PEG_{HD} diffused out of the Alg-Kcoil20% hydrogel to the surrounding PBS medium after 24 h, while 63 ± 4 % and 62 ± 8 % of the particles were released from Alg-Kcoil10% and Alg-Kcoil0%, respectively (Figure 4.6). In Alg-Kcoil20% at 24 h, Ecoil-decorated nanoparticles,

NP-CEE-PEG_{HD}, were retained twice as much as the nanoparticles with PEG only (42% and 86% of release, respectively). Interestingly, there were no statistically significant differences between NP-CEE-PEG_{HD} and NP-PEG_{HD} in Alg-Kcoil0% at any timepoint ($n \geq 4$, $p > 0.05$). This showed that (a) the surface presentation of Cys-Ecoil-EGF had no detectable influence on NPs release in absence of Kcoil and that (b) differences in NPs surface chemistry did not affect the structure of the gel. The variations in release fraction between NP-PEG_{HD} and NP-CEE-PEG_{HD} in the Kcoil-containing hydrogels could therefore not be attributed to CEE/alginate interactions but rather confirmed that the surface presentation of the Ecoil-tagged protein hindered the mobility and decreased the release of nanoparticles via the formation of the Ecoil/Kcoil complex.

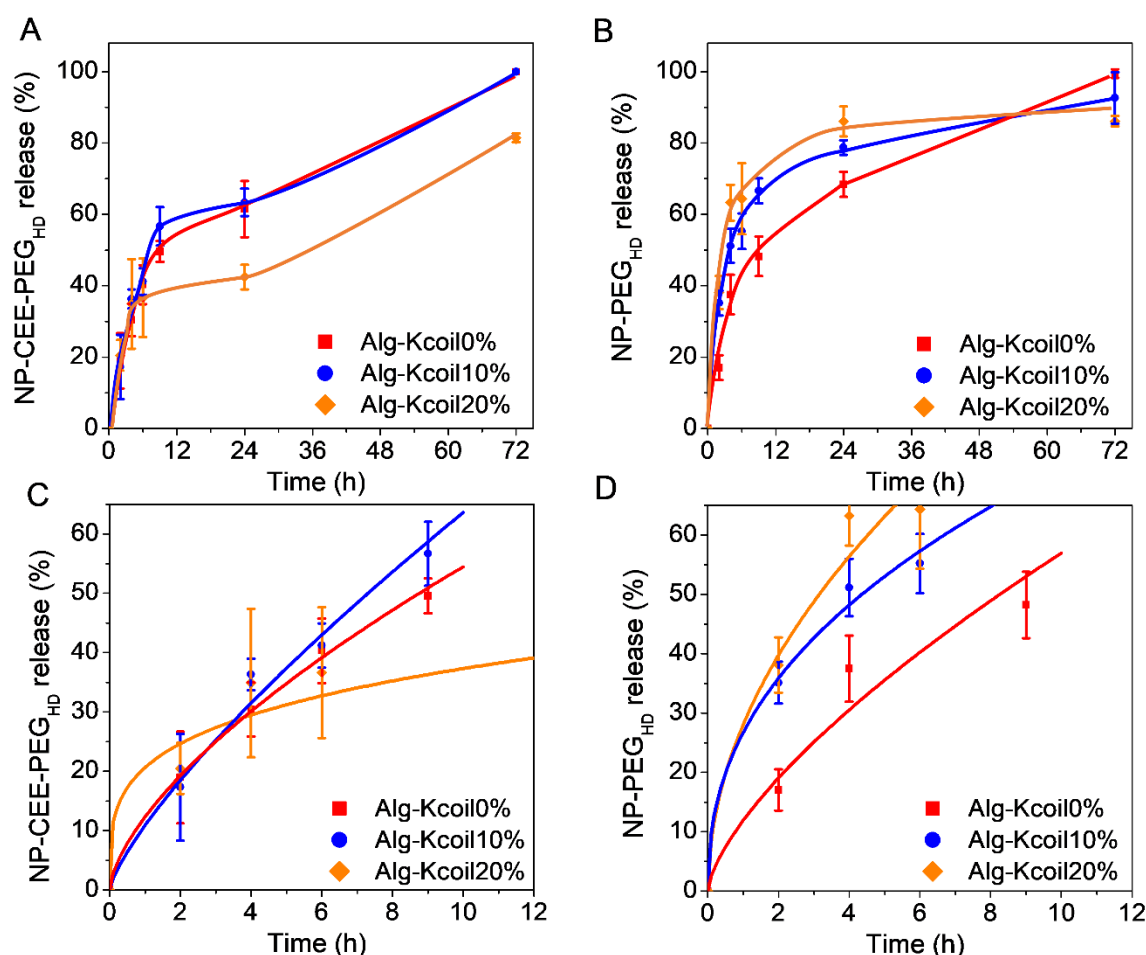


Figure 4.6 : NPs release from Kcoil-modified alginate hydrogels. NP-CEE-PEG_{HD} (A) and NP-PEG_{HD} (B) are released from Alg-Kcoil0%, Alg-Kcoil10% and Alg-Kcoil20%, as calculated from the number of NPs still entrapped in the gel relative to $t = 0$. NP-CEE-PEG_{HD} (C) and NP-PEG_{HD} (D) data were fitted with a power-law model: each exponent was found to be between

0.43 and 1, characteristic of diffusion (both Fickian and non-Fickian), except for NP-CEE-PEG_{HD} in Alg-Kcoil20%. ($n \geq 4$)

Altogether, the data revealed that the introduction of the Kcoil peptide in the hydrogel and its Ecoil partner on the nanoparticles slowed down the release of particles thanks to specific Ecoil/Kcoil interactions, despite conflicting changes in the bulk properties of the gel. So to understand the mechanism behind NP release, the experimental NPs release curves were fitted using a power-law model as described by Ritger and Peppas [131], [132] :

$$y = kt^n, \quad (6)$$

where y is the fractional solute release, k is a constant, t the release time and n is the diffusional exponent. The fitted parameters are shown in Table 2.

In all but one case, diffusional exponents were found between 0.43 and 1, which is characteristic of a purely diffusive mechanism (0.43 being purely Fickian and]0.43;1[describing an anomalous transport, i.e. a mix of Fickian and non-Fickian diffusions). For NP-CEE- PEG_{HD} in Alg-Kcoil20% only, a diffusional exponent n of 0.25 was calculated, which means that the power-law model cannot be applied and that the release mechanism cannot be explained by diffusion only. In that specific case, it was thus apparent that another mechanism was contributing to the release of the particles, most likely the specific Ecoil/Kcoil interaction.

It is also worth mentioning that the initial burst release of NP-CEE-PEG_{HD} was both larger and longer in Alg-Kcoil10% (ca. 60% of total NPs between 0 and 9 h) than in Alg-Kcoil20% (ca. 40% of total NPs within 6 h, Figure 5.A). Following this burst, the behavior of the particles in both gels were highly similar: little to no particle release from 12 to 24 h, then a slow and steady release with the same apparent rate between 24 and 72 h (36.6 and 39.0% of particle loss in Alg-Kcoil10% and Alg-Kcoil20%, respectively). Conversely, NP-PEG_{HD} release curves did not feature a clear breakpoint and the release rate progressively decreased. The multiple-staged release of NP-CEE-PEG_{HD} could be attributed to two different NPs subpopulations, one that did not or poorly interact

with the Kcoil and was thus rapidly eliminated, and a second one that was entrapped in the gel due to the formation of Ecoil/Kcoil complexes and was thus more gradually released.

Tableau 3 : Results of the fitting parameters obtained using Eq. 6

	NP-CEE-PEG_{HD}			NP-PEG_{HD}		
	n	k	R ²	n	k	R ²
Alg-Kcoil0%	0.65	0.12	1.00	0.68	0.12	0.89
Alg-Kcoil10%	0.77	0.11	0.96	0.43	0.27	0.95
Alg-Kcoil20%	0.26	0.21	0.72	0.50	0.28	0.89

n: exponent of the power-law, included between 0.43 and 1 for the model

k: multiplication factor of the Power Law

R²: determination coefficient of the fittings

Parameters were fitted using a linear regression on $\ln(y) = f(\ln(t))$

Altogether, both DDM and release tests demonstrated that coiled-coil interactions have a significant impact on the diffusive properties of the nanoparticles in hydrogels by slowing their release, from the combination of the structure of the gel and coil interactions. DDM was found to be a useful predictor of the release flux of NPs in gels by characterizing *D* and correlating it to actual release of NPs.

4.8.4.3 Bioactivity of released NPs

To assess the biological potency of the NPs that were first entrapped in gels then released in PBS (for a total of 72 h spent in the multiwell plate), an EGFR phosphorylation assay was conducted as previously described. The NP-CEE-PEG_{HD} that were collected after their release showed a strong phosphorylation induction, to an extent highly similar to fresh NPs and equivalent to 4.4 nM of

soluble EGF (to be compared with 4.9 nM for fresh particles, cf. Figure 4.3). This experiment highlighted that the bioactivity of the EGF moiety on the surface of the released NP remained unaffected by the trapping and release process, critical to achieve any desired therapeutic response. This further strengthened our confidence in coiled-coil affinity-based drug delivery system as versatile tool to deliver, in a timely manner, nanoparticles to a specific tissue, as here explored for cells expressing EGF receptors.

4.9 Conclusions

Herein we report the use of coiled-coil interactions to extend the release rate of EGF-decorated gold nanoparticles from an alginate hydrogel. The proposed approach relies on the covalent grafting of the Ecoil peptide on NPs and its complementary partner, the Kcoil, on alginate chains. As a proof of concept, we showed that, when compared to AuNPs with PEG only, AuNPs decorated with both the Ecoil peptide and the epidermal growth factor were released more slowly from hydrogels that featured a high Kcoil peptide content. The released AuNPs were still able to induce EGFR-receptor activation via surface-grafted EGF.

To the best of our knowledge, we here showed for the first time that the delivery of a bioactive cue can be controlled by using an affinity-based hybrid system, that is, a nanoparticulate carrier entrapped within a hydrogel using specific affinity interactions. This strategy offers a wide range of applications. Gold NPs have indeed been widely used in photothermal therapy, radiotherapy, imaging and drug delivery. This system could also be applied to other types of nanoparticles (e.g. liposomes or polymeric NPs) for the delivery of either hydrophilic or hydrophobic drugs. Indeed, the use of coiled-coil peptides provides a high level of versatility, as these peptides are highly stable and can be grafted on virtually any molecule or structure. Moreover, the rationale design of the peptide sequences should allow for a high level of tunability in the thermodynamics of the interaction and therefore in the release rates of the therapeutics of interest.

4.10 Notes

The authors declare no competing financial interest.

4.11 Acknowledgement

This work was supported by the Canada Research Chairs on Protein-enhanced Biomaterials (G.D.C) and on Bioinspired Materials (X.B.), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant (G.D.C and X.B.), by the Biomedical Science and Technology Research Group (B.L., F.M., and G.D.C.) and the Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (F.M.). The present work was funded by the TransMedTech Institute (B.L. and F.M.) and its main funding partner, the Canada First Research Excellence Fund. We would like to thank S. Bilodeau for NMR measurements and C. Ribeiro for ELISA assay.

4.12 References

- [6] G. De Crescenzo, J. R. Litowski, R. S. Hodges, et M. D. O'Connor-McCourt, « Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de Novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding », *Biochemistry*, vol. 42, n° 6, p. 1754-1763, févr. 2003.
- [7] F. Murschel, C. Fortier, M. Jolicoeur, R. S. Hodges, et G. De Crescenzo, « Two Complementary Approaches for the Controlled Release of Biomolecules Immobilized via Coiled-Coil Interactions: Peptide Core Mutations and Multivalent Presentation », *Biomacromolecules*, vol. 18, n° 3, p. 965-975, mars 2017.
- [36] S. Her, D. A. Jaffray, et C. Allen, « Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements », *Radiother. Cancer Present Future*, vol. 109, p. 84-101, janv. 2017.
- [37] K. Sokolov *et al.*, « Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 9, p. 1999-2004, mai 2003.
- [55] K. Vulic et M. S. Shoichet, « Affinity-Based Drug Delivery Systems for Tissue Repair and Regeneration », *Biomacromolecules*, vol. 15, n° 11, p. 3867-3880, nov. 2014.
- [56] V. Delplace, J. Obermeyer, et M. S. Shoichet, « Local Affinity Release », *ACS Nano*, vol. 10, n° 7, p. 6433-6436, juill. 2016.
- [60] I. Freeman et S. Cohen, « The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization », *Biomaterials*, vol. 30, n° 11, p. 2122-2131, avr. 2009.

- [61] T. R. Thatiparti, A. J. Shoffstall, et H. A. von Recum, « Cyclodextrin-based device coatings for affinity-based release of antibiotics », *Biomaterials*, vol. 31, n° 8, p. 2335-2347, mars 2010.
- [64] C.-C. Lin et K. S. Anseth, « Controlling Affinity Binding with Peptide-Functionalized Poly(ethylene glycol) Hydrogels », *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, n° 14, p. 2325, juill. 2009.
- [66] W. Mulyasmita, L. Cai, Y. Hori, et S. C. Heilshorn, « Avidity-Controlled Delivery of Angiogenic Peptides from Injectable Molecular-Recognition Hydrogels », *Tissue Eng. Part A*, vol. 20, n° 15-16, p. 2102-2114, août 2014.
- [67] B. Song *et al.*, « Sustained local delivery of bioactive nerve growth factor in the central nervous system via tunable diblock copolypeptide hydrogel depots », *Biomaterials*, vol. 33, n° 35, p. 9105-9116, déc. 2012.
- [75] D. A. D. Parry, R. D. B. Fraser, et J. M. Squire, « Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure », *J. Struct. Biol.*, vol. 163, n° 3, p. 258-269, sept. 2008.
- [77] B. Apostolovic, M. Danial, et H.-A. Klok, « Coiled coils: attractive protein folding motifs for the fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, n° 9, p. 3541-3575, sept. 2010.
- [85] S. Noel *et al.*, « Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications », *Acta Biomater.*, vol. 37, p. 69-82, juin 2016.
- [87] K. M. El-Say et H. S. El-Sawy, « Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery », *Int J Pharm.*, vol. 528, n° 1, p. 675-691, août 2017.
- [88] S. Hassan *et al.*, « Evolution and clinical translation of drug delivery nanomaterials », *Nano Today*, vol. 15, p. 91-106, août 2017.
- [89] A. Kakkar, G. Traverso, O. C. Farokhzad, R. Weissleder, et R. Langer, « Evolution of macromolecular complexity in drug delivery systems », *Nat Rev Chem*, vol. 1, n° 8, p. 0063, août 2017.
- [90] M. R. Battig, B. Soontornworajit, et Y. Wang, « Programmable Release of Multiple Protein Drugs from Aptamer-Functionalized Hydrogels via Nucleic Acid Hybridization », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 30, p. 12410-12413, août 2012.
- [91] M. J. Webber et R. Langer, « Drug delivery by supramolecular design », *Chem Soc Rev*, vol. 46, n° 21, p. 6600-6620, 2017.
- [92] H. Cheng *et al.*, « Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery », *Drug Disc Today*, vol. 22, n° 9, p. 1336-1350, sept. 2017.
- [93] T. Vermonden, R. Censi, et W. E. Hennink, « Hydrogels for Protein Delivery », *Chem. Rev.*, vol. 112, n° 5, p. 2853-2888, mai 2012.
- [94] K. J. Rambhia et P. X. Ma, « Controlled drug release for tissue engineering », *J Control. Release*, vol. 219, p. 119-128, déc. 2015.
- [95] S. Eskandari, T. Guerin, I. Toth, et R. J. Stephenson, « Recent advances in self-assembled peptides: Implications for targeted drug delivery and vaccine engineering », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 110-111, p. 169-187, févr. 2017.

- [96] Y. Wu et J. H. Collier, « α -Helical coiled-coil peptide materials for biomedical applications », *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 9, n° 2, p. e1424, mars 2017.
- [97] M. Pechar *et al.*, « Coiled Coil Peptides as Universal Linkers for the Attachment of Recombinant Proteins to Polymer Therapeutics », *Biomacromolecules*, vol. 12, n° 10, p. 3645-3655, oct. 2011.
- [98] Y. Assal, Y. Mizuguchi, M. Mie, et E. Kobatake, « Growth Factor Tethering to Protein Nanoparticles via Coiled-Coil Formation for Targeted Drug Delivery », *Bioconjug. Chem.*, vol. 26, n° 8, p. 1672-1677, août 2015.
- [99] S. Siew, M. Kaneko, M. Mie, et E. Kobatake, « Construction of a tissue-specific transcription factor-tethered extracellular matrix protein via coiled-coil helix formation », *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, n° 14, p. 2512-2518, mars 2016.
- [100] R. S. Riley et E. S. Day, « Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment », *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 9, n° 4, p. e1449, juill. 2017.
- [101] F.-Y. Kong, J.-W. Zhang, R.-F. Li, Z.-X. Wang, W.-J. Wang, et W. Wang, « Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications », *Molecules*, vol. 22, n° 9, p. 1445, sept. 2017.
- [102] L. Agüero, D. Zaldivar-Silva, L. Peña, et M. L. Dias, « Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review », *Carbohydr. Polym.*, vol. 168, p. 32-43, juill. 2017.
- [103] F. Zhao, D. Yao, R. Guo, L. Deng, A. Dong, et J. Zhang, « Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications », *Nanomater. Basel Switz.*, vol. 5, n° 4, p. 2054-2130, déc. 2015.
- [104] E. Mauri, S. Papa, M. Masi, P. Veglianesi, et F. Rossi, « Novel functionalization strategies to improve drug delivery from polymers », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 14, n° 11, p. 1305-1313, nov. 2017.
- [105] N. Riahi, F. Murschel, S. Lerouge, Y. Durocher, O. Henry, et G. De Crescenzo, « Bioavailability of immobilized epidermal growth factor: Covalent versus noncovalent grafting », *Biointerphases*, vol. 12, n° 1, p. 010501, 21 2017.
- [106] S. Kumar, J. Aaron, et K. Sokolov, « Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties », *Nat. Protoc.*, vol. 3, n° 2, p. 314-320, févr. 2008.
- [107] H. Hinterwirth, S. Kappel, T. Waitz, T. Prohaska, W. Lindner, et M. Lämmerhofer, « Quantifying Thiol Ligand Density of Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry », *ACS Nano*, vol. 7, n° 2, p. 1129-1136, févr. 2013.
- [108] X. Liu, M. Atwater, J. Wang, et Q. Huo, « Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 58, n° 1, p. 3-7, juill. 2007.
- [109] A. M. Smith *et al.*, « Quantitative Analysis of Thiolated Ligand Exchange on Gold Nanoparticles Monitored by ^1H NMR Spectroscopy », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 5, p. 2771-2778, mars 2015.

- [110] F. Murschel, B. Liberelle, G. St-Laurent, M. Jolicoeur, Y. Durocher, et G. De Crescenzo, « Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor », *Acta Biomater.*, vol. 9, n° 6, p. 6806-6813, juin 2013.
- [111] D. Spellman, E. McEvoy, G. O’Cuinn, et R. J. FitzGerald, « Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. », *International Dairy Journal*, p. 447-453, 2003.
- [112] S. Noel, B. Liberelle, L. Robitaille, et G. De Crescenzo, « Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces », *Bioconjug. Chem.*, vol. 22, n° 8, p. 1690-1699, août 2011.
- [113] R. Cerbino et V. Trappe, « Differential Dynamic Microscopy: Probing Wave Vector Dependent Dynamics with a Microscope », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, n° 18, p. 188102, mai 2008.
- [114] P. Edera, D. Bergamini, V. Trappe, F. Giavazzi, et R. Cerbino, « Differential dynamic microscopy microrheology of soft materials: A tracking-free determination of the frequency-dependent loss and storage moduli », *Phys. Rev. Mater.*, vol. 1, n° 7, p. 073804, déc. 2017.
- [115] M. A. Escobedo-Sánchez *et al.*, « Microliter viscometry using a bright-field microscope: η -DDM », *Soft Matter*, vol. 14, n° 34, p. 7016-7025, août 2018.
- [116] V. A. Martinez, J. Schwarz-Linek, M. Reufer, L. G. Wilson, A. N. Morozov, et W. C. K. Poon, « Flagellated bacterial motility in polymer solutions », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, n° 50, p. 17771-17776, déc. 2014.
- [117] V. A. Martinez *et al.*, « Differential Dynamic Microscopy: A High-Throughput Method for Characterizing the Motility of Microorganisms », *Biophys. J.*, vol. 103, n° 8, p. 1637-1647, oct. 2012.
- [118] M. Reufer, V. A. Martinez, P. Schurtenberger, et W. C. K. Poon, « Differential Dynamic Microscopy for Anisotropic Colloidal Dynamics », *Langmuir*, vol. 28, n° 10, p. 4618-4624, mars 2012.
- [119] L. G. Wilson *et al.*, « Differential Dynamic Microscopy of Bacterial Motility », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 106, n° 1, p. 018101, janv. 2011.
- [120] C. Boucher, G. St-Laurent, M. Loignon, M. Jolicoeur, G. De Crescenzo, et Y. Durocher, « The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags », *Tissue Eng. Part A*, vol. 14, n° 12, p. 2069-2077, déc. 2008.
- [121] K. Rahme, L. Chen, R. G. Hobbs, M. A. Morris, C. O’Driscoll, et J. D. Holmes, « PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions », *RSC Adv.*, vol. 3, n° 17, p. 6085-6094, 2013.
- [122] J. P. Boon, R. Nossal, et S.-H. Chen, « Light-Scattering Spectrum Due to Wiggling Motions of Bacteria », *Biophys. J.*, vol. 14, n° 11, p. 847-864, nov. 1974.
- [123] L. Song, N. Falzone, et K. A. Vallis, « EGF-coated gold nanoparticles provide an efficient nano-scale delivery system for the molecular radiotherapy of EGFR-positive cancer », *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 92, n° 11, p. 716-723, nov. 2016.

- [124] Y. Yarden, I. Harari, et J. Schlessinger, « Purification of an active EGF receptor kinase with monoclonal antireceptor antibodies », *J. Biol. Chem.*, vol. 260, n° 1, p. 315-319, janv. 1985.
- [125] B. Liberelle, C. Boucher, J. Chen, M. Jolicoeur, Y. Durocher, et G. De Crescenzo, « Impact of Epidermal Growth Factor Tethering Strategy on Cellular Response », *Bioconjug. Chem.*, vol. 21, n° 12, p. 2257-2266, déc. 2010.
- [126] T. T. Nielsen, V. Wintgens, C. Amiel, R. Wimmer, et K. L. Larsen, « Facile Synthesis of β -Cyclodextrin-Dextran Polymers by “Click” Chemistry », *Biomacromolecules*, vol. 11, n° 7, p. 1710-1715, juill. 2010.
- [127] C. D. Kinh, T. V. Thien, T. T. Hoa, et D. Q. Khieu, « Interpretation of ^1H -NMR spectrum of alginate by ^1H - ^1H TOCSY and COSY spectrum », *Vietnam J. Chem.*, vol. 45, n° 6, p. 772, 2007.
- [128] A. C. Engler, H. Lee, et P. T. Hammond, « Highly Efficient “Grafting onto” a Polypeptide Backbone Using Click Chemistry », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, n° 49, p. 9334-9338, nov. 2009.
- [129] K. G. Patel et J. R. Swartz, « Surface Functionalization of Virus-Like Particles by Direct Conjugation Using Azide-Alkyne Click Chemistry », *Bioconjug. Chem.*, vol. 22, n° 3, p. 376-387, mars 2011.
- [130] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, et D. Thom, « Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model », *FEBS Lett.*, vol. 32, n° 1, p. 195-198, mai 1973.
- [131] P. L. Ritger et N. A. Peppas, « A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices », *J. Controlled Release*, vol. 5, n° 1, p. 37-42, juin 1987.
- [132] P. L. Ritger et N. A. Peppas, « A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs », *J. Controlled Release*, vol. 5, n° 1, p. 23-36, juin 1987.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif principal de ce projet de recherche était de montrer qu'il est possible de contrôler la libération de NPs par un hydrogel grâce à un système d'affinité. Les résultats rapportés dans le **chapitre 4** attestent de la réussite de cet objectif. En effet, une libération plus lente des NPs fonctionnalisées avec le Ecoil est mesurée lorsque l'hydrogel d'alginate contient une quantité suffisante de peptide Kcoil.

Cependant, l'ensemble des sous-objectifs du projet n'a pas été entièrement rempli. En effet, pour l'objectif I, nous souhaitions : (i) synthétiser des nanoparticules, (ii) créer une bibliothèque de nanoparticules portant des quantités différentes de Ecoil à la surface, (iii) caractériser complètement et exhaustivement les nanoparticules. La synthèse des NPs, a été réalisée en suivant la méthode de Turkevitch. Cette méthode a été choisie pour sa simplicité (peu de réactifs, rapide, une seule étape). Elle permettait également d'obtenir des NPs de 18 nm, ce qui nous semblait une taille idéale pour un modèle de nanovecteurs. Une caractérisation de la taille des NPs (DLS), de la densité de PEG et EGF en surface a été menée à chaque étape de la fonctionnalisation. Cependant, créer une bibliothèque de NPs portant en surface des quantités de peptides Ecoil différentes n'a pas été possible. Deux principaux problèmes se sont posés pour atteindre cet objectif : (i) quantifier le nombre de peptides Ecoil greffés (ii) maîtriser le protocole de greffage pour pouvoir greffer différentes quantités de peptides. La quantification du Ecoil greffé à la surface n'a pas été possible de façon directe. En effet, les méthodes de quantification disponibles étaient des méthodes colorimétriques (UV-Vis) ou fluorométriques (quantification des amines par TNBS ou CBQCA, absorbance de la liaison peptidique, *etc*). Néanmoins, ces méthodes sont inadaptées dans notre cas en raison de la forte absorbance des NPs d'or et les faibles concentrations de protéines. Il a donc été décidé au cours du projet d'étiqueter le facteur de croissance EGF au Ecoil et de quantifier la protéine chimère par un ELISA indirect.

Le deuxième problème, maîtriser le protocole de greffage, a perduré pendant l'ensemble du projet. Plusieurs études ont été menées pour optimiser le rendement de greffage de la protéine. Nous avons étudié l'influence de différentes solutions (PBS, MES, eauMQ) ainsi que différents pHs (variant de 5 à 9). Cependant, aucune de ces conditions n'a permis d'obtenir une quantité de EGF/NPs élevée de façon répétable. Des détergents (Tween, BSA et dextran) ont également été utilisés pour

limiter l'adsorption non spécifique de la protéine et des NPs sur la verrerie utilisée. Il est à noter que trop de détergent semblait bloquer le greffage de la protéine. Finalement, des conditions simples (eauMQ avec 10 mg/L de dextran) ont été retenues. Ces conditions permettent d'obtenir 1.0 ± 0.6 EGF par NPs (quantifié par ELISA). Cette valeur est plus faible que celle espérée, mais peut être nuancée par les résultats obtenus par les tests de phosphorylation des récepteurs EGF (Figure 4.3). Les NPs fonctionnalisées avec le CEE (1.5 nM de EGF en ELISA) correspondent à une réponse cellulaire similaire à une concentration de 5 ± 2 nM de EGF soluble. Nous avons deux hypothèses pour expliquer cela : 1) la quantité de EGF greffé est supérieure à celle mesurée en ELISA, 2) il y a un effet synergique de l'activation des dimères du récepteur EGF par deux EGF proches [125]. Les deux hypothèses peuvent bien sûr coexister. D'autre part, il est intéressant de noter que notre protéine Cys-Ecoil-EGF est volumineuse en comparaison de nos NPs (quelques nanomètres). Si l'on souhaite augmenter la densité de greffage, il serait peut-être bon d'envisager une taille de NPs plus importante pour augmenter la place disponible en surface. De même, une forme de NPs augmentant la surface (nanobâtonnets par exemple) pourrait être étudiée. Enfin, nous avons ajouté un thiol en bout de chaîne sur notre Ecoil-EGF pour le greffer sur les NPs. Néanmoins, le fait que notre contrôle du EGF seul présente une densité de EGF plus importante nous montre que nous ne greffons pas forcément notre Cys-Ecoil-EGF par le thiol. La littérature appuie cela puisque les amines ont tendance à s'adsorber sur l'or (EGF présente 3 amines en surface).

L'objectif II consistait à fonctionnaliser un hydrogel avec le Kcoil et caractériser les rendements de réaction. L'alginate a été choisi comme hydrogel pour les raisons exposées au **chapitre 3**. La méthode de greffage choisie devait optimiser les rendements, le coût du Kcoil étant très important. Dans notre laboratoire, du Kcoil étiqueté avec un thiol était auparavant greffé sur des surfaces de dextran modifié avec du divinylsulfone. Cependant, cette réaction avait un très faible rendement. Les résultats d'une autre étudiante en maîtrise montraient que des rendements plus importants pouvaient être atteints en utilisant une chimie click de cycloaddition azide-alcyne. Nous avons donc tout d'abord modifié les chaînes d'alginate avec un alcyne en greffant du glycidyl propargyl ether (GPE). Le Kcoil a ensuite été greffé avec une chimie click alcyne-azide. Ces deux réactions ont été caractérisées et la chimie click permet d'obtenir d'excellents rendements (77%). Néanmoins, nous avons observé que l'ajout de ces fragments dans le gel modifie la structure de l'hydrogel une fois réticulé. Nous supposons que la grande quantité de fragments de GPE et de Kcoil dans le gel perturbe la réticulation de l'alginate. Des tests d'indentation ont été menés pour caractériser les

propriétés mécaniques des hydrogels avec différentes quantités de Kcoil. Cependant, les hydrogels ont des caractéristiques trop faibles pour pouvoir être mesurées avec nos équipements.

Notre dernier objectif était de comparer la libération des différentes NPs de notre bibliothèque par des hydrogels comportant différentes quantités de Kcoil. Puisque la bibliothèque de NPs n'a pas pu être générée, nous avons seulement pu étudier l'effet de l'augmentation de la concentration de Kcoil dans l'hydrogel sur la libération de nos NPs. Il a été montré qu'une quantité minimale de Kcoil était nécessaire pour ralentir la libération des NPs par rapport au contrôle. Les courbes de libération des NPs fonctionnalisées montrent une libération en deux étapes : 1) une première libération rapide (40% des NPs en 12h) puis 2) une libération plus lente et soutenue. Ce comportement suggère fortement qu'il y a deux types de NPs dispersées dans le gel. Une première population qui n'interagit pas ou très peu avec le Kcoil présent dans le gel, soit car le Kcoil n'est pas dispersé de façon homogène dans le gel puisque des chaînes d'alginate comportant du Kcoil sont ajoutées à des chaînes sans Kcoil, soit car les NPs ne présentent aucun Ecoil en surface (rappelons que la densité moyenne est de 1 Ecoil/NP) ou encore car le Ecoil n'est pas présenté correctement à la surface des NPs. La deuxième population de NPs, elle, est ralentie lors de sa diffusion dans le gel par les interactions Kcoil/Ecoil qui se forment.

De plus, nous avons également développé des NPs capables de cibler des cellules, de par le facteur de croissance épidermique, EGF, greffé à leur surface. EGF est un facteur de croissance qui agit dans l'ensemble des tissus et favorise l'activité mitotique des cellules. Ce travail préliminaire a donc ouvert des portes vers de nombreuses applications. Des NPs fonctionnalisées avec EGF pourraient donc être utilisées en médecine régénératrice. Les cellules cancéreuses surexpriment généralement les récepteurs EGF, nos NPs ont donc également un potentiel en thérapie cancéreuse. Dans le futur, les NPs d'or pourront continuer à être utilisées dans des applications de radiothérapie, thérapie photothermique ou même en administration de médicaments si celui-ci est greffé en surface. Dans les deux premiers cas, la technique de fonctionnalisation devra être adaptée sur des NPs plus grosses. Elles pourraient aussi être remplacées par des NPs polymériques, encapsulant un PA, pour une thérapie régénératrice ou pour administrer un médicament.

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce projet de maîtrise vise à surmonter un défi majeur de l'administration de médicaments, le contrôle de la libération du PA. De nombreuses solutions ont été proposées comme il a été abordé dans la revue de littérature, au chapitre 2, mais aucune ne présente une vraie universalité. Le travail présenté ici s'articule donc autour de l'hypothèse suivante : l'utilisation de peptides superhélices permet de moduler la vitesse de libération de nanoparticules d'un hydrogel.

Afin de valider cette hypothèse, trois objectifs ont été énoncés dans le chapitre 1 et les travaux réalisés ont abouti à la réussite partielle de ceux-ci. En effet, des nanoparticules fonctionnalisées avec le Ecoil et le facteur de croissance EGF ont bien été synthétisées, mais il n'a pas été possible de contrôler la quantité de Ecoil et EGF greffés en surface. La biofonctionnalisation des chaînes d'alginate a été menée avec succès, même si le grand nombre de groupements alcyne n'ayant pas réagi perturbe légèrement la réticulation lors de la gélification de l'hydrogel. Enfin, il a été vérifié que la concentration de Kcoil dans l'hydrogel avait un impact sur la libération des NPs.

Des études précédentes au sein du laboratoire ont permis le développement de peptides comportant des mutations sur la séquence d'acides aminés, ce qui fait varier l'affinité de la superhélice [7]. Des travaux futurs pourront donc s'attacher à vérifier s'il est possible de contrôler la libération des NPs en modulant l'affinité entre les peptides Ecoil et Kcoil. Cette approche serait extrêmement intéressante pour l'administration de plusieurs PA à différents temps par le même hydrogel.

La démonstration de notre hypothèse ouvre plusieurs opportunités de travaux et d'applications futures. Ce système pourrait tout d'abord être adapté pour la thérapie cancéreuse en utilisant les propriétés photothermiques des NPs d'or. Le EGF greffé en surface permet de cibler les cellules cancéreuses qui surexpriment le récepteur EGF et une illumination avec un laser permet de tuer ces cellules de façon efficace et localisée. La thérapie photothermique est un domaine très actif et prometteur dans la thérapie cancéreuse [133], [134]. Cependant, il est à noter que la taille ou la forme des nanoparticules est à modifier pour une telle application afin d'optimiser la résonance plasmon. Les NPs d'or peuvent également être utilisées en imagerie pour le diagnostic des tumeurs.

Le système développé lors de ce travail peut également être adapté avec des NPs polymériques qui encapsulent le PA pour administrer diverses molécules thérapeutiques hydrophobes ou

hydrophiles. Une adaptation du système est également possible en médecine régénératrice pour livrer des facteurs de croissance, des protéines ou autres agents thérapeutiques aux nouveaux tissus à l'intérieur d'une matrice extracellulaire que représente l'hydrogel. L'hydrogel utilisé devra avoir des propriétés mécaniques importantes, il sera donc judicieux d'utiliser une méthode de réticulation non influencée par les groupements alcynes et le Kcoil sur les chaînes.

En somme, ce travail préliminaire a abouti à un constat important : les peptides superhélices peuvent être utilisés pour la libération contrôlée de PA. Ce résultat pourra être mis à profit pour le développement de nombreux systèmes à libération contrôlée.

RÉFÉRENCES

- [1] HAS, « Haute Autorité de Santé - Règle des 5B ». [En ligne]. Disponible sur: has-sante.fr.
- [2] K. Park, « Drug Delivery Research: The Invention Cycle », *Mol. Pharm.*, vol. 13, n° 7, p. 2143-2147, juill. 2016.
- [3] H. Park, K. Park, et W. S. W. Shalaby, *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*. CRC Press, 2011.
- [4] K. Na, K. H. Lee, D. H. Lee, et Y. H. Bae, « Biodegradable thermo-sensitive nanoparticles from poly(l-lactic acid)/poly(ethylene glycol) alternating multi-block copolymer for potential anti-cancer drug carrier », *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 27, n° 2, p. 115-122, févr. 2006.
- [5] B. Jeong, Y. H. Bae, D. S. Lee, et S. W. Kim, « Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems », *Nature*, vol. 388, n° 6645, p. 860-862, août 1997.
- [6] G. De Crescenzo, J. R. Litowski, R. S. Hodges, et M. D. O'Connor-McCourt, « Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de Novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding », *Biochemistry*, vol. 42, n° 6, p. 1754-1763, févr. 2003.
- [7] F. Murschel, C. Fortier, M. Jolicoeur, R. S. Hodges, et G. De Crescenzo, « Two Complementary Approaches for the Controlled Release of Biomolecules Immobilized via Coiled-Coil Interactions: Peptide Core Mutations and Multivalent Presentation », *Biomacromolecules*, vol. 18, n° 3, p. 965-975, mars 2017.
- [8] M. Ferrari, « Cancer nanotechnology: opportunities and challenges », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, n° 3, p. 161-171, mars 2005.
- [9] M. Ferrari, « Nanovector therapeutics », *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 9, n° 4, p. 343-346, août 2005.
- [10] A. D. Bangham et R. W. Horne, « Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope », *J. Mol. Biol.*, vol. 8, n° 5, p. 660-IN10, janv. 1964.
- [11] G. Bozzuto et A. Molinari, « Liposomes as nanomedical devices », *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, p. 975-999, 2015.
- [12] H.-I. Chang et M.-K. Yeh, « Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy », *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, p. 49-60, 2012.
- [13] D. Carugo, E. Bottaro, J. Owen, E. Stride, et C. Nastruzzi, « Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors », *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 25876, mai 2016.
- [14] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S. Y. Wu, A. K. Sood, et S. Hua, « Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery », *Front. Pharmacol.*, vol. 6, p. 286, 2015.
- [15] G. Gainza, S. Villullas, J. L. Pedraz, R. M. Hernandez, et M. Igartua, « Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration », *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 11, n° 6, p. 1551-1573, août 2015.

- [16] G. Sharma, S. Anabousi, C. Ehrhardt, et M. N. V. Ravi Kumar, « Liposomes as targeted drug delivery systems in the treatment of breast cancer », *J. Drug Target.*, vol. 14, n° 5, p. 301-310, juin 2006.
- [17] S. . Wissing, O. Kayser, et R. . Müller, « Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery », *Adv. Lipid-Based Drug Solubilization Target.*, vol. 56, n° 9, p. 1257-1272, mai 2004.
- [18] A. Puri *et al.*, « Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. », *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 26, n° 6, p. 523-580, 2009.
- [19] C. Olbrich, A. Gessner, O. Kayser, et R. H. Müller, « Lipid-drug-conjugate (LDC) nanoparticles as novel carrier system for the hydrophilic antitrypanosomal drug diminazenediacetate », *J. Drug Target.*, vol. 10, n° 5, p. 387-396, août 2002.
- [20] G. Gainza, S. Villullas, J. L. Pedraz, R. M. Hernandez, et M. Igartua, « Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration », *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 11, n° 6, p. 1551-1573, août 2015.
- [21] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, et W. E. Rudzinski, « Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices », *J. Controlled Release*, vol. 70, n° 1, p. 1-20, janv. 2001.
- [22] S. S. Guterres, M. P. Alves, et A. R. Pohlmann, « Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications », *Drug Target Insights*, vol. 2, p. 147-157, juill. 2007.
- [23] S. Mura, J. Nicolas, et P. Couvreur, « Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery », *Nat. Mater.*, vol. 12, p. 991, oct. 2013.
- [24] J.-Z. Du, X.-J. Du, C.-Q. Mao, et J. Wang, « Tailor-Made Dual pH-Sensitive Polymer-Doxorubicin Nanoparticles for Efficient Anticancer Drug Delivery », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, n° 44, p. 17560-17563, nov. 2011.
- [25] H. Yu *et al.*, « Enzyme sensitive, surface engineered nanoparticles for enhanced delivery of camptothecin », *J. Controlled Release*, vol. 216, p. 111-120, oct. 2015.
- [26] A.-L. Papa *et al.*, « Ultrasound-sensitive nanoparticle aggregates for targeted drug delivery », *Biomaterials*, vol. 139, p. 187-194, sept. 2017.
- [27] S. Yu *et al.*, « Magnetic and pH-sensitive nanoparticles for antitumor drug delivery », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 103, p. 15-22, mars 2013.
- [28] N. Fomina, C. McFearin, M. Sermsakdi, O. Edigin, et A. Almutairi, « UV and Near-IR triggered release from polymeric nanoparticles », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 28, p. 9540-9542, juill. 2010.
- [29] B. Gidwani et A. Vyas, « A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs », *BioMed Res. Int.*, vol. 2015, 2015.
- [30] Z. P. Xu, Q. H. Zeng, G. Q. Lu, et A. B. Yu, « Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 61, n° 3, p. 1027-1040, févr. 2006.

- [31] W.-S. Cho *et al.*, « Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles », *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 236, n° 1, p. 16-24, avr. 2009.
- [32] C. Kneuer *et al.*, « Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA », *Int. J. Pharm.*, vol. 196, n° 2, p. 257-261, mars 2000.
- [33] E. Csapó, D. Ungor, Á. Juhász, G. K. Tóth, et I. Dékány, « Gold nanohybrid systems with tunable fluorescent feature: Interaction of cysteine and cysteine-containing peptides with gold in two- and three-dimensional systems », *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 511, p. 264-271, déc. 2016.
- [34] K. J. Widder, R. M. Morris, G. A. Poore, D. P. Howard, et A. E. Senyei, « Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats », *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, vol. 19, n° 1, p. 135-139, janv. 1983.
- [35] S. Wang *et al.*, « Cantharidin-encapsulated thermal-sensitive liposomes coated with gold nanoparticles for enhanced photothermal therapy on A431 cells », *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, p. 2143-2160, 2018.
- [36] S. Her, D. A. Jaffray, et C. Allen, « Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements », *Radiother. Cancer Present Future*, vol. 109, p. 84-101, janv. 2017.
- [37] K. Sokolov *et al.*, « Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles », *Cancer Res.*, vol. 63, n° 9, p. 1999-2004, mai 2003.
- [38] Piyush Gupta, K. Vermani, et S. Garg, « Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery », *Drug Discov. Today*, vol. 7, n° 10, p. 569-579, mai 2002.
- [39] T. R. Hoare et D. S. Kohane, « Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges », *Polymer*, vol. 49, n° 8, p. 1993-2007, avr. 2008.
- [40] J. A. Burdick et G. D. Prestwich, « Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications », *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla*, vol. 23, n° 12, p. H41-56, mars 2011.
- [41] Q. S. Zhao, Q. X. Ji, K. Xing, X. Y. Li, C. S. Liu, et X. G. Chen, « Preparation and characteristics of novel porous hydrogel films based on chitosan and glycerophosphate », *Carbohydr. Polym.*, vol. 76, n° 3, p. 410-416, avr. 2009.
- [42] A. K. A. Silva, M. Juenet, A. Meddahi-Pellé, et D. Letourneur, « Polysaccharide-based strategies for heart tissue engineering », *Carbohydr. Polym.*, vol. 116, p. 267-277, févr. 2015.
- [43] B. Jeong, S. W. Kim, et Y. H. Bae, « Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, p. 154-162, déc. 2012.
- [44] M. R. de Moura, M. R. Guilherme, G. M. Campese, E. Radovanovic, A. F. Rubira, et E. C. Muniz, « Porous alginate-Ca²⁺ hydrogels interpenetrated with PNIPAAm networks: Interrelationship between compressive stress and pore morphology », *Eur. Polym. J.*, vol. 41, n° 12, p. 2845-2852, déc. 2005.
- [45] N. Bhattarai, J. Gunn, et M. Zhang, « Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, n° 1, p. 83-99, janv. 2010.

- [46] X. Huang et C. S. Brazel, « On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems », *J. Controlled Release*, vol. 73, n° 2, p. 121-136, juin 2001.
- [47] K. R. Kamath et K. Park, « Biodegradable hydrogels in drug delivery », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 11, n° 1, p. 59-84, juill. 1993.
- [48] R. V. Kulkarni et S. Biswanath, « Electrically Responsive Smart Hydrogels in Drug Delivery: A Review », *J. Appl. Biomater. Biomech.*, vol. 5, n° 3, p. 125-139, sept. 2007.
- [49] I. Tokarev et S. Minko, « Stimuli-responsive hydrogel thin films », *Soft Matter*, vol. 5, n° 3, p. 511-524, 2009.
- [50] S. K. De, N. R. Aluru, B. Johnson, W. C. Crone, D. J. Beebe, et J. Moore, « Equilibrium swelling and kinetics of pH-responsive hydrogels: models, experiments, and simulations », *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 11, n° 5, p. 544-555, oct. 2002.
- [51] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. M. Dave, S. G. Kumbar, et W. E. Rudzinski, « Stimulus-Responsive “Smart” Hydrogels as Novel Drug Delivery Systems », *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 28, n° 8, p. 957-974, janv. 2002.
- [52] W. Zhang *et al.*, « Synthesis and characterization of thermally responsive Pluronic F127-chitosan nanocapsules for controlled release and intracellular delivery of small molecules », *ACS Nano*, vol. 4, n° 11, p. 6747-6759, nov. 2010.
- [53] C. Alvarez-Lorenzo et A. Concheiro, « Reversible adsorption by a pH- and temperature-sensitive acrylic hydrogel », *J. Controlled Release*, vol. 80, n° 1, p. 247-257, avr. 2002.
- [54] Y. Qiu et K. Park, « Environment-sensitive hydrogels for drug delivery », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 53, n° 3, p. 321-339, déc. 2001.
- [55] K. Vulic et M. S. Shoichet, « Affinity-Based Drug Delivery Systems for Tissue Repair and Regeneration », *Biomacromolecules*, vol. 15, n° 11, p. 3867-3880, nov. 2014.
- [56] V. Delplace, J. Obermeyer, et M. S. Shoichet, « Local Affinity Release », *ACS Nano*, vol. 10, n° 7, p. 6433-6436, juill. 2016.
- [57] B. L. Seal et A. Panitch, « Viscoelastic Behavior of Environmentally Sensitive Biomimetic Polymer Matrices », *Macromolecules*, vol. 39, n° 6, p. 2268-2274, mars 2006.
- [58] N. X. Wang et H. A. von Recum, « Affinity-based drug delivery », *Macromol. Biosci.*, vol. 11, n° 3, p. 321-332, mars 2011.
- [59] I. Freeman, A. Kedem, et S. Cohen, « The effect of sulfation of alginate hydrogels on the specific binding and controlled release of heparin-binding proteins », *Biomaterials*, vol. 29, n° 22, p. 3260-3268, août 2008.
- [60] I. Freeman et S. Cohen, « The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization », *Biomaterials*, vol. 30, n° 11, p. 2122-2131, avr. 2009.
- [61] T. R. Thatiparti, A. J. Shoffstall, et H. A. von Recum, « Cyclodextrin-based device coatings for affinity-based release of antibiotics », *Biomaterials*, vol. 31, n° 8, p. 2335-2347, mars 2010.
- [62] T. R. Thatiparti et H. A. von Recum, « Cyclodextrin complexation for affinity-based antibiotic delivery », *Macromol. Biosci.*, vol. 10, n° 1, p. 82-90, janv. 2010.

- [63] M. R. Battig, B. Soontornworajit, et Y. Wang, « Programmable Release of Multiple Protein Drugs from Aptamer-Functionalized Hydrogels via Nucleic Acid Hybridization », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 30, p. 12410-12413, août 2012.
- [64] C.-C. Lin et K. S. Anseth, « Controlling Affinity Binding with Peptide-Functionalized Poly(ethylene glycol) Hydrogels », *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, n° 14, p. 2325, juill. 2009.
- [65] K. Vulic et M. S. Shoichet, « Tunable Growth Factor Delivery from Injectable Hydrogels for Tissue Engineering », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 2, p. 882-885, janv. 2012.
- [66] W. Mulyasasmita, L. Cai, Y. Hori, et S. C. Heilshorn, « Avidity-Controlled Delivery of Angiogenic Peptides from Injectable Molecular-Recognition Hydrogels », *Tissue Eng. Part A*, vol. 20, n° 15-16, p. 2102-2114, août 2014.
- [67] B. Song *et al.*, « Sustained local delivery of bioactive nerve growth factor in the central nervous system via tunable diblock copolypeptide hydrogel depots », *Biomaterials*, vol. 33, n° 35, p. 9105-9116, déc. 2012.
- [68] C.-C. Lin et A. T. Metters, « Enhanced protein delivery from photopolymerized hydrogels using a pseudospecific metal chelating ligand », *Pharm. Res.*, vol. 23, n° 3, p. 614-622, mars 2006.
- [69] C.-C. Lin et A. T. Metters, « Metal-chelating affinity hydrogels for sustained protein release », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 83, n° 4, p. 954-964, déc. 2007.
- [70] F. Guzmán, S. Barberis, et A. Illanes, « Peptide synthesis: chemical or enzymatic », *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 10, n° 2, p. 279-314, avr. 2007.
- [71] G. Walsh, « Therapeutic insulins and their large-scale manufacture », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 67, n° 2, p. 151-159, avr. 2005.
- [72] C. Pinilla, J. R. Appel, P. Blanc, et R. A. Houghten, « Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. », *BioTechniques*, vol. 13, n° 6, p. 901-905, déc. 1992.
- [73] M. B. Braun *et al.*, « Peptides in headlock – a novel high-affinity and versatile peptide-binding nanobody for proteomics and microscopy », *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 19211, janv. 2016.
- [74] R. B. Hill, D. P. Raleigh, A. Lombardi, et W. F. DeGrado, « De Novo Design of Helical Bundles as Models for Understanding Protein Folding and Function », *Acc. Chem. Res.*, vol. 33, n° 11, p. 745-754, nov. 2000.
- [75] D. A. D. Parry, R. D. B. Fraser, et J. M. Squire, « Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure », *J. Struct. Biol.*, vol. 163, n° 3, p. 258-269, sept. 2008.
- [76] E. H. C. Bromley et K. J. Channon, « Alpha-helical peptide assemblies giving new function to designed structures », *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 103, p. 231-275, 2011.
- [77] B. Apostolovic, M. Danial, et H.-A. Klok, « Coiled coils: attractive protein folding motifs for the fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, n° 9, p. 3541-3575, sept. 2010.
- [78] J. M. Mason et K. M. Arndt, « Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications », *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.*, vol. 5, n° 2, p. 170-176, févr. 2004.

- [79] H. Chao, D. L. Bautista, J. Litowski, R. T. Irvin, et R. S. Hodges, « Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification. », *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.*, vol. 715, n° 1, p. 307-329, sept. 1998.
- [80] H. Chao *et al.*, « Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil: use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains », *Biochemistry*, vol. 35, n° 37, p. 12175-12185, sept. 1996.
- [81] G. De Crescenzo, P. L. Pham, Y. Durocher, et M. D. O'Connor-McCourt, « Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) Binding to the Extracellular Domain of the Type II TGF- β Receptor: Receptor Capture on a Biosensor Surface Using a New Coiled-coil Capture System Demonstrates that Avidity Contributes Significantly to High Affinity Binding », *J. Mol. Biol.*, vol. 328, n° 5, p. 1173-1183, mai 2003.
- [82] P. U. Le, A. E. G. Lenferink, M. Pinard, J. Baardsnes, B. Massie, et M. D. O'Connor-McCourt, « Escherichia coli expression and refolding of E/K-coil-tagged EGF generates fully bioactive EGF for diverse applications », *Protein Expr. Purif.*, vol. 64, n° 2, p. 108-117, avr. 2009.
- [83] F. Murschel, B. Liberelle, G. St-Laurent, M. Jolicoeur, Y. Durocher, et G. De Crescenzo, « Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor », *Acta Biomater.*, vol. 9, n° 6, p. 6806-6813, juin 2013.
- [84] P. Lequoy, F. Murschel, B. Liberelle, S. Lerouge, et G. De Crescenzo, « Controlled co-immobilization of EGF and VEGF to optimize vascular cell survival », *Acta Biomater.*, vol. 29, p. 239-247, janv. 2016.
- [85] S. Noel *et al.*, « Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications », *Acta Biomater.*, vol. 37, p. 69-82, juin 2016.
- [86] C. Fortier, G. De Crescenzo, et Y. Durocher, « A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery », *Biomaterials*, vol. 34, n° 4, p. 1344-1353, janv. 2013.
- [87] K. M. El-Say et H. S. El-Sawy, « Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery », *Int J Pharm.*, vol. 528, n° 1, p. 675-691, août 2017.
- [88] S. Hassan *et al.*, « Evolution and clinical translation of drug delivery nanomaterials », *Nano Today*, vol. 15, p. 91-106, août 2017.
- [89] A. Kakkar, G. Traverso, O. C. Farokhzad, R. Weissleder, et R. Langer, « Evolution of macromolecular complexity in drug delivery systems », *Nat Rev Chem*, vol. 1, n° 8, p. 0063, août 2017.
- [90] M. R. Battig, B. Soontornworajit, et Y. Wang, « Programmable Release of Multiple Protein Drugs from Aptamer-Functionalized Hydrogels via Nucleic Acid Hybridization », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 30, p. 12410-12413, août 2012.
- [91] M. J. Webber et R. Langer, « Drug delivery by supramolecular design », *Chem Soc Rev*, vol. 46, n° 21, p. 6600-6620, 2017.
- [92] H. Cheng *et al.*, « Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery », *Drug Disc Today*, vol. 22, n° 9, p. 1336-1350, sept. 2017.

- [93] T. Vermonden, R. Censi, et W. E. Hennink, « Hydrogels for Protein Delivery », *Chem. Rev.*, vol. 112, n° 5, p. 2853-2888, mai 2012.
- [94] K. J. Rambhia et P. X. Ma, « Controlled drug release for tissue engineering », *J Control. Release*, vol. 219, p. 119-128, déc. 2015.
- [95] S. Eskandari, T. Guerin, I. Toth, et R. J. Stephenson, « Recent advances in self-assembled peptides: Implications for targeted drug delivery and vaccine engineering », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 110-111, p. 169-187, févr. 2017.
- [96] Y. Wu et J. H. Collier, « α -Helical coiled-coil peptide materials for biomedical applications », *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 9, n° 2, p. e1424, mars 2017.
- [97] M. Pechar *et al.*, « Coiled Coil Peptides as Universal Linkers for the Attachment of Recombinant Proteins to Polymer Therapeutics », *Biomacromolecules*, vol. 12, n° 10, p. 3645-3655, oct. 2011.
- [98] Y. Assal, Y. Mizuguchi, M. Mie, et E. Kobatake, « Growth Factor Tethering to Protein Nanoparticles via Coiled-Coil Formation for Targeted Drug Delivery », *Bioconjug. Chem.*, vol. 26, n° 8, p. 1672-1677, août 2015.
- [99] S. Siew, M. Kaneko, M. Mie, et E. Kobatake, « Construction of a tissue-specific transcription factor-tethered extracellular matrix protein via coiled-coil helix formation », *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, n° 14, p. 2512-2518, mars 2016.
- [100] R. S. Riley et E. S. Day, « Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment », *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 9, n° 4, p. e1449, juill. 2017.
- [101] F.-Y. Kong, J.-W. Zhang, R.-F. Li, Z.-X. Wang, W.-J. Wang, et W. Wang, « Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications », *Molecules*, vol. 22, n° 9, p. 1445, sept. 2017.
- [102] L. Agüero, D. Zaldivar-Silva, L. Peña, et M. L. Dias, « Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review », *Carbohydr. Polym.*, vol. 168, p. 32-43, juill. 2017.
- [103] F. Zhao, D. Yao, R. Guo, L. Deng, A. Dong, et J. Zhang, « Composites of Polymer Hydrogels and Nanoparticulate Systems for Biomedical and Pharmaceutical Applications », *Nanomater. Basel Switz.*, vol. 5, n° 4, p. 2054-2130, déc. 2015.
- [104] E. Mauri, S. Papa, M. Masi, P. Veglianesi, et F. Rossi, « Novel functionalization strategies to improve drug delivery from polymers », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 14, n° 11, p. 1305-1313, nov. 2017.
- [105] N. Riahi, F. Murschel, S. Lerouge, Y. Durocher, O. Henry, et G. De Crescenzo, « Bioavailability of immobilized epidermal growth factor: Covalent versus noncovalent grafting », *Biointerphases*, vol. 12, n° 1, p. 010501, 21 2017.
- [106] S. Kumar, J. Aaron, et K. Sokolov, « Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties », *Nat. Protoc.*, vol. 3, n° 2, p. 314-320, févr. 2008.
- [107] H. Hinterwirth, S. Kappel, T. Waitz, T. Prohaska, W. Lindner, et M. Lämmerhofer, « Quantifying Thiol Ligand Density of Self-Assembled Monolayers on Gold Nanoparticles

- by Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry », *ACS Nano*, vol. 7, n° 2, p. 1129-1136, févr. 2013.
- [108] X. Liu, M. Atwater, J. Wang, et Q. Huo, « Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 58, n° 1, p. 3-7, juill. 2007.
- [109] A. M. Smith *et al.*, « Quantitative Analysis of Thiolated Ligand Exchange on Gold Nanoparticles Monitored by ¹H NMR Spectroscopy », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 5, p. 2771-2778, mars 2015.
- [110] F. Murschel, B. Liberelle, G. St-Laurent, M. Jolicoeur, Y. Durocher, et G. De Crescenzo, « Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor », *Acta Biomater.*, vol. 9, n° 6, p. 6806-6813, juin 2013.
- [111] D. Spellman, E. McEvoy, G. O’Cuinn, et R. J. FitzGerald, « Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. », *International Dairy Journal*, p. 447-453, 2003.
- [112] S. Noel, B. Liberelle, L. Robitaille, et G. De Crescenzo, « Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces », *Bioconjug. Chem.*, vol. 22, n° 8, p. 1690-1699, août 2011.
- [113] R. Cerbino et V. Trappe, « Differential Dynamic Microscopy: Probing Wave Vector Dependent Dynamics with a Microscope », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, n° 18, p. 188102, mai 2008.
- [114] P. Edera, D. Bergamini, V. Trappe, F. Giavazzi, et R. Cerbino, « Differential dynamic microscopy microrheology of soft materials: A tracking-free determination of the frequency-dependent loss and storage moduli », *Phys. Rev. Mater.*, vol. 1, n° 7, p. 073804, déc. 2017.
- [115] M. A. Escobedo-Sánchez *et al.*, « Microliter viscometry using a bright-field microscope: η -DDM », *Soft Matter*, vol. 14, n° 34, p. 7016-7025, août 2018.
- [116] V. A. Martinez, J. Schwarz-Linek, M. Reufer, L. G. Wilson, A. N. Morozov, et W. C. K. Poon, « Flagellated bacterial motility in polymer solutions », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, n° 50, p. 17771-17776, déc. 2014.
- [117] V. A. Martinez *et al.*, « Differential Dynamic Microscopy: A High-Throughput Method for Characterizing the Motility of Microorganisms », *Biophys. J.*, vol. 103, n° 8, p. 1637-1647, oct. 2012.
- [118] M. Reufer, V. A. Martinez, P. Schurtenberger, et W. C. K. Poon, « Differential Dynamic Microscopy for Anisotropic Colloidal Dynamics », *Langmuir*, vol. 28, n° 10, p. 4618-4624, mars 2012.
- [119] L. G. Wilson *et al.*, « Differential Dynamic Microscopy of Bacterial Motility », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 106, n° 1, p. 018101, janv. 2011.
- [120] C. Boucher, G. St-Laurent, M. Loignon, M. Jolicoeur, G. De Crescenzo, et Y. Durocher, « The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags », *Tissue Eng. Part A*, vol. 14, n° 12, p. 2069-2077, déc. 2008.

- [121] K. Rahme, L. Chen, R. G. Hobbs, M. A. Morris, C. O'Driscoll, et J. D. Holmes, « PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions », *RSC Adv.*, vol. 3, n° 17, p. 6085-6094, 2013.
- [122] J. P. Boon, R. Nossal, et S.-H. Chen, « Light-Scattering Spectrum Due to Wiggling Motions of Bacteria », *Biophys. J.*, vol. 14, n° 11, p. 847-864, nov. 1974.
- [123] L. Song, N. Falzone, et K. A. Vallis, « EGF-coated gold nanoparticles provide an efficient nano-scale delivery system for the molecular radiotherapy of EGFR-positive cancer », *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 92, n° 11, p. 716-723, nov. 2016.
- [124] Y. Yarden, I. Harari, et J. Schlessinger, « Purification of an active EGF receptor kinase with monoclonal antireceptor antibodies », *J. Biol. Chem.*, vol. 260, n° 1, p. 315-319, janv. 1985.
- [125] B. Liberelle, C. Boucher, J. Chen, M. Jolicoeur, Y. Durocher, et G. De Crescenzo, « Impact of Epidermal Growth Factor Tethering Strategy on Cellular Response », *Bioconjug. Chem.*, vol. 21, n° 12, p. 2257-2266, déc. 2010.
- [126] T. T. Nielsen, V. Wintgens, C. Amiel, R. Wimmer, et K. L. Larsen, « Facile Synthesis of β -Cyclodextrin-Dextran Polymers by "Click" Chemistry », *Biomacromolecules*, vol. 11, n° 7, p. 1710-1715, juill. 2010.
- [127] C. D. Kinh, T. V. Thien, T. T. Hoa, et D. Q. Khieu, « Interpretation of ^1H -NMR spectrum of alginate by ^1H - ^1H TOCSY and COSY spectrum », *Vietnam J. Chem.*, vol. 45, n° 6, p. 772, 2007.
- [128] A. C. Engler, H. Lee, et P. T. Hammond, « Highly Efficient "Grafting onto" a Polypeptide Backbone Using Click Chemistry », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, n° 49, p. 9334-9338, nov. 2009.
- [129] K. G. Patel et J. R. Swartz, « Surface Functionalization of Virus-Like Particles by Direct Conjugation Using Azide-Alkyne Click Chemistry », *Bioconjug. Chem.*, vol. 22, n° 3, p. 376-387, mars 2011.
- [130] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, et D. Thom, « Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model », *FEBS Lett.*, vol. 32, n° 1, p. 195-198, mai 1973.
- [131] P. L. Ritger et N. A. Peppas, « A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices », *J. Controlled Release*, vol. 5, n° 1, p. 37-42, juin 1987.
- [132] P. L. Ritger et N. A. Peppas, « A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs », *J. Controlled Release*, vol. 5, n° 1, p. 23-36, juin 1987.
- [133] A. K. Rengan *et al.*, « In Vivo Analysis of Biodegradable Liposome Gold Nanoparticles as Efficient Agents for Photothermal Therapy of Cancer », *Nano Lett.*, vol. 15, n° 2, p. 842-848, févr. 2015.
- [134] R. S. Riley et E. S. Day, « Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment », *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 9, n° 4, 2017.